



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b> C07K 13/00, C12N 15/19 C12P 21/02, A61K 37/02 C12N 5/10, 1/19	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 92/09629</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 11 juin 1992 (11.06.92)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR91/00949 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 29 novembre 1991 (29.11.91)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 90/14961 29 novembre 1990 (29.11.90) FR  <b>(71) Déposant (JP seulement):</b> ELF SANOFI [FR/FR]; 32-34, rue Marbeuf, F-75008 Paris (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> CAPUT, Daniel [FR/FR]; 10, rue Temponnières, F-31000 Toulouse (FR). FERRARA, Pascual [AR/FR]; Lieu-dit "Libouille", Saint-Assiscle, Avignonet, F-31290 Villefranche-de-Lauragais (FR). MILOUX, Brigitte [FR/FR]; 6, chemin de Safrana, F-31450 Montgiscard (FR). MINTY, Adrian [GB/FR]; Chemin de Pechmirol, F-31320 Mervilla (FR). VITA, Natalio [IT/FR]; 25, rue de Prunet, F-31650 Saint-Orens (FR).		<b>(74) Mandataires:</b> GILLARD, Marie-Louise etc. ; Cabinet Beau de Loménie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR).  <b>(81) Etats désignés:</b> JP, US.  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> PROTEIN PRESENTING AN ACTIVITY OF THE CYTOKINE TYPE, RECOMBINANT DNA, EXPRESSION VECTOR AND HOSTS USED TO PRODUCE SUCH PROTEIN  <b>(54) Titre:</b> PROTEINE PRESENTANT UNE ACTIVITE DE TYPE CYTOKINE, ADN RECOMBINANT, VECTEUR D'EXPRESSION ET HOTES PERMETTANT SON OBTENTION  <div style="text-align: center;">             Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu (a1)              1 5 10               Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile              1 5 10 15               Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr (a2)              20 25 30               Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp              35 40 45               Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe           </div>		
<b>(57) Abstract</b> 50 55 60  The invention relates to a protein presenting an activity of the cytokine type which has the sequence (a1) and immediately upstream of the sequence (a1), a portion of the sequence (a2) or of a sequence differing by one or a plurality of amino acids from the sequence (a2) and conferring to the protein the same activity. Application: medicament useful particularly as anticancer or immunomodulator agent.  <b>(57) Abrégé</b>  L'invention a pour objet une protéine présentant une activité de type cytokine qui comprend la séquence (a1), et immédiatement en amont de la séquence (a1), une partie de la séquence (a2), ou d'une séquence différant de un ou plusieurs acides aminés de la séquence (a2) et conférant à la protéine la même activité. Application: médicament utile notamment comme anticancéreux ou immunomodulateur.		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brazil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU <sup>+</sup>	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

+ Toute désignation de "SU" produit ses effets dans la Fédération de Russie. On ignore encore si une telle désignation produit ses effets dans les autres Etats de l'ancienne Union soviétique.

Protéine présentant une activité de type cytokine, ADN recombinant, vecteur d'expression et hôtes permettant son obtention.

---

La présente invention a pour objet une nouvelle protéine présentant une activité de type cytokine, les outils de génie génétique pour la produire, à savoir  
5 un ADN recombinant, un vecteur d'expression portant cet ADN recombinant, les microorganismes procaryotes et les cellules eucaryotes contenant cet ADN recombinant ainsi qu'un médicament, utile notamment comme anticancéreux ou immunomodulateur, contenant à titre de principe actif cette protéine.

Il est bien connu que le système immunitaire comprend des éléments  
10 cellulaires et des substances solubles sécrétées par ces derniers, appelées cytokines. Celles-ci sont des protéines qui assurent la communication entre une cellule émettrice et une cellule cible appartenant, soit au système immunitaire, soit à un autre système biologique de l'organisme. Les cytokines ont en général une activité biologique dite pléiotropique : elles peuvent avoir de multiples  
15 actions sur la cellule cible : prolifération, différenciation, cytolyse, activation, chimiotactisme, etc... Plusieurs de ces molécules ont déjà trouvé des applications en thérapeutique : par exemple, l'interleukine-2 ou l'interféron- $\alpha$  utilisées pour le traitement de certaines tumeurs par immunothérapie et les facteurs myélopoïétiques tels que le GCSF (Granulocyte Colony Stimulating  
20 Factor) ou le GMCSF (Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor) qui stimulent la croissance et la différenciation des cellules sanguines et permettent ainsi l'enrichissement en ces dernières du sang appauvri en celles-ci suite à une chimiothérapie.

Une des premières cytokines découvertes est l'interleukine-1, à laquelle  
25 on a d'abord attribué une activité centrale dans l'inflammation : le chimiotactisme des neutrophiles, suite à des expériences montrant une activité de ce type in vivo après injection (J. Oppenheim et al, 1986, Imm. Today, 7, 45-56). On sait aujourd'hui que l'interleukine-1 stimule in vivo l'expression d'une autre cytokine chimiotactique vis-à-vis de neutrophiles, l'interleukine-8  
30 (initialement appelée Neutrophil Chemotactic Factor NCF). Cette cytokine, dont la séquence d'acides aminés a été déterminée en 1987 après isolement et purification ainsi que par clonage et séquençage de son ADN complémentaire (K. Matsushima et al. 1988. J. Exp. Med., 1883-1893), est homologue à d'autres cytokines déjà connues à la date de sa découverte : les cytokines  
35 produites par les granules  $\alpha$  des plaquettes telles que le PF4 (Platelet Factor 4) et le PBP (Platelet Basic Protein). La famille des protéines connues homologues à l'interleukine-8, appelée habituellement famille SIS (pour Small Induced

- Secreted proteins), s'est considérablement agrandie depuis 1987 [J. Oppenheim et al., 1991, *Ann. Rev. Immun.*, 9, 617]. Elle compte aujourd'hui notamment : gro (également appelée MGSA : Melanoma Growth Stimulatory Activity) décrite par A. Anisowicz et al, 1987, *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*, 84, 7188-7192
- 5 et A. Richmond et al, 1988, *EMBO J.*, 7, 2025-2033, RANTES (Regulated upon Activation Normal T Expressed and presumably Secreted) décrite par T. Schall et al, 1988, *J. Imm.*, 141, 1018-1025, MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein 1) décrite par S.D. Wolpe et al, 1988, *J. Exp. Med.*, 167, 570-581, MIP2 (Macrophage Inflammatory Protein 2) décrite par S.D. Wolpe
- 10 et al, 1989, *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*, 86, 612-616 et MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1 également appelée MCAF : Monocyte chemotactic and Activating Factor) décrite par Yoshimura et al, 1989, *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*, 84, 9233-9237 et K. Matsushima et al, 1989, *J. Expr. Med.*, 169, 1485-1489.
- 15 La cytokine MCP-1, isolée d'une lignée de gliome par T. Yoshimura, référence ci-dessus, ainsi que d'une lignée monocyttaire par K. Matsushima et al, référence ci-dessus, existe sous deux formes de masses moléculaires apparentes 13 et 15 kDa, appelées MCP-1 $\alpha$  et MCP-1 $\beta$  qui semblent correspondre à des modifications post-traductionnelles [Y. Jiang et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265, 1318-321]. La cytokine MCP-1 a une activité
- 20 chimiotactique pour les monocytes et les basophiles mais pas pour les neutrophiles (E.J. Leonard, 1990, *Immunology Today*, 11, 3, 97-101) et un effet stimulateur de l'activité cytotatique des monocytes sur certaines lignées tumorales (K. Matsushima et al, 1989, *J. Exp. Med.*, 169, 1485-1490).
- 25 Les études de structures tridimensionnelles par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ou diffraction des rayons X de l'interleukine-8 et de PF4 ont montré que ces deux cytokines ont la même conformation, avec un peptide carboxyterminal de 12 à 15 acides aminés en forme d'hélice  $\alpha$  (R. St. Charles et al, 1988, *J. Biol. Chem.*, 264, 4, 2092-2099
- 30 et G.M. Clore, 1990, *Biochem.*, 29, 1689-1696). Selon G.M. Clore, la plupart des cytokines de la famille SIS ont une telle partie carboxy terminale en forme d'hélice  $\alpha$ , le rôle de cette hélice restant à déterminer [C. Herbert et al., 1991, *J. Biol. Chem.*, 266, 18989-994].
- On a montré récemment que le peptide carboxy-terminal de 13 acides
- 35 aminés peut présenter l'activité antiangiogénique (inhibition de la prolifération

des vaisseaux sanguins) de la cytokine PF4 (T. Maione et al., 1990, Science, 247, 77-79). Selon D.G. Osterman, 1982, Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 130-135, ce peptide a une activité chimiotactique vis-à-vis des monocytes trente fois supérieure à celle de PF4.

- 5 La présente invention concerne une nouvelle protéine présentant une activité de type cytokine, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence (a1) suivante :

Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu  
1 5 10

- 10 et immédiatement en amont de la séquence (a1), une partie de la séquence (a2) suivante :

Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile  
1 5 10 15  
Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr  
15 20 25 30  
Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp  
35 40 45  
Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe  
50 55 60

- 20 ou une séquence différent de ladite séquence (a2) par un ou plusieurs acides aminés et conférant à la protéine la même activité, ou en ce qu'elle comprend la séquence (a2)

Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile  
1 5 10 15  
25 Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr  
20 25 30  
Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp  
35 40 45  
Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe  
30 50 55 60

et immédiatement en aval de (a2) la séquence (a1)

Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu  
1 5 10

- ou une séquence différent de la séquence (a1) par un ou plusieurs acides aminés  
35 et conférant à la protéine la même activité.

- 4 -

La partie de la séquence (a2) immédiatement en amont de la séquence (a1), peut être choisie parmi les séquences suivantes :

Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe et Gln Asp Phe

1 5

5 De préférence la partie de la séquence (a2) immédiatement en amont de la séquence (a1), est choisie parmi la séquence (a2) et les séquences (a3) et (a4) ci-après :

(a3) Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile Asn Lys

1 5 10 15

10 Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr Ser Ser

20 25 30

His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp Lys Glu

35 40 45

Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe

15 50 55 60

et

(a4) Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr Ser Ser

1 5 10 15

His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp Lys Glu

20 20 25 30

Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe

35 40 45

ou parmi les séquences qui diffèrent de un ou plusieurs acides aminés de la séquence (a2), (a3) ou (a4), et confèrent à la protéine la même activité.

25 La séquence (a2) est particulièrement appréciée, la protéine comportant alors éventuellement un blocage aminoterminal. La séquence de la protéine et le blocage aminoterminal correspondent probablement à ceux de la protéine exporté de cellules mononucléaires du sang périphérique dans des conditions stimulant l'expression de cytokines. Cette protéine présente, en ce qui concerne  
30 sa séquence d'acides aminés, une certaine ressemblance avec celle de la cytokine MCP-1, et, comme cette dernière elle possède une activité de type cytokine. Elle constitue un nouveau membre de la famille SIS.

Cette protéine est de préférence sous une forme qui présente une masse moléculaire apparente, déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide  
35 en présence de SDS de  $9 \pm 2$ ,  $11 \pm 2$ , ou  $16 \pm 2$  kDa. Cette protéine est

avantageusement N-glycosylée en particulier lorsqu'elle est sous une forme de masse moléculaire apparente  $16 \pm 2$  kDa. Cette protéine est avantageusement O-glycosylée en particulier lorsqu'elle est sous une forme de masse moléculaire apparente de  $11 \pm 2$  kDa.

- 5 Cette protéine a de préférence un degré de pureté, déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et révélation au nitrate d'argent, supérieur à 90 %, et en particulier supérieur à 95 %.

- L'invention a aussi pour objet un ADN recombinant caractérisé en ce qu'il code pour la protéine précédente, laquelle peut être alors obtenue à partir  
10 du lysat cellulaire ou, avantageusement, pour un précurseur de la protéine précédente. Ce précurseur comprend de préférence une séquence signal

- Cette séquence signal, choisie en fonction de la cellule hôte, a pour fonction de permettre l'exportation de la protéine recombinante en dehors du cytoplasme, ce qui permet à la protéine recombinante de prendre une  
15 conformation proche de celle de la protéine naturelle et facilite considérablement sa purification. Cette séquence signal peut être clivée, soit en une seule étape par une signal-peptidase que libère la protéine mature, soit en plusieurs étapes lorsque cette séquence signal comprend en plus de la séquence éliminée par la signal-peptidase, appelée peptide signal ou séquence pré, une  
20 séquence éliminée plus tardivement au cours de un ou plusieurs événements protéolytiques, appelée séquence pro.

- Pour une expression dans les microorganismes procaryotes, tels que par exemple *Escherichia coli*, cette séquence signal peut être, soit une séquence dérivée d'un précurseur naturel d'une protéine exportée par un microorganisme  
25 procaryote (par exemple le peptide signal OMPa (Grayeb et al, 1984, EMBO Journal, 3, 2437-2442) ou celui de la phosphatase alcaline (Michaelis et al, J. Bact. 1983, 154, 366-374), soit une séquence non endogène provenant d'un précurseur eucaryote (par exemple le peptide signal de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine), soit un peptide signal  
30 synthétique (par exemple celui décrit dans la demande de brevet français n° 2 636 643, de séquence :

Met Ala Pro Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu

1

5

10

15

Cys Leu Pro Ser Trp Asn Ala Gly Ala).

35

20

25

- 6 -

Pour une expression dans les cellules eucaryotes telles que les ascomycètes, par exemple la levure Saccharomyces cerevisiae ou le champignon filamenteux Cryphonectria parasitica, cette séquence signal est de préférence une séquence dérivée d'un précurseur naturel d'une protéine sécrétée par ces cellules, par exemple pour la levure le précurseur de l'invertase (demande de brevet EP-0123289) ou le précurseur de la séquence prépro de la phéromone alpha, (demande de brevet DK 2484/84), ou pour Cryphonectria parasitica, celui de la séquence prépro de l'endothiapepsine, de séquence :

	Met	Ser	Ser	Pro	Leu	Lys	Asn	Ala	Leu	Val	Thr	Ala	Met	Leu	Ala	Gly
10	1				5					10					15	
	Gly	Ala	Leu	Ser	Ser	Pro	Thr	Lys	Gln	His	Val	Gly	Ile	Pro	Val	Asn
					20					25					30	
	Ala	Ser	Pro	Glu	Val	Gly	Pro	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe	Lys	Gln	Val	Arg
					35					40					45	
15	Asn	Pro	Asn	Tyr	Lys	Phe	Asn	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Lys	Lys	Thr	Tyr
					50					55					60	
	Leu	Lys	Tyr	Gly	Val	Pro	Ile	Pro	Ala	Trp	Leu	Glu	Asp	Ala	Val	Gln
					65					70					75	80
	Asn	Ser	Thr	Ser	Gly	Leu	Ala	Glu	Arg							
20										85						

Pour une expression dans les cellules animales, on utilise comme séquence signal, soit une séquence signal d'une protéine de cellule animale connue pour être exportée -par exemple le peptide signal de l'un des précurseurs naturels de l'hormone de croissance humaine, déjà connu pour permettre la sécrétion de l'interleukine-2 (cf. la demande de brevet français n° 2 619 711)-, soit l'une des trois séquences signal explicitées ci-dessous.

	(b1)	Met	Lys	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	
		1						5								15	
30		Phe	Ser	Pro	Gln	Gly	Leu	Ala									
								20									
	(b2)	Met	Pro	Ser	Pro	Ser	Asn	Met	Lys	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Leu
		1						5						10		15	
		Leu	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Phe	Ser	Pro	Gln	Gly	Leu	Ala			
35								20						25			



- 7 -

et

(b3) Met Trp Lys Pro Met Pro Ser Pro Ser Asn Met Lys Ala Ser Ala Ala  
           1                  5                  10                  15  
 5 Leu Leu Cys Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Phe Ser Pro Gln Gly Leu  
                   20                  25                  30  
       Ala

avantageusement codées par les séquences (Nb1), (Nb2) et (Nb3) suivantes :

10

(Nb1) ATGAAAGCCT CTGCAGCACT TCTGTGTCTG CTGCTCACAG  
       CAGCTGCTTT CAGCCCCCAG GGGCTTGCT

15

(Nb2) ATGCCCTCAC CCTCCAACAT GAAAGCCTCT GCAGCACTTC  
       TGTGTCTGCT GCTCACAGCA GCTGCTTTCA GCCCCCAGGG  
       GCTTGCT

et

20 (Nb3) ATGTGGAAGC CCATGCCCTC ACCCTCCAAC ATGAAAGCCT  
       CTGCAGCACT TCTGTGTCTG CTGCTCACAG CAGCTGCTTT  
       CAGCCCCCAG GGGCTTGCT

25 La séquence nucléotidique codant pour la protéine mature est par  
 exemple la séquence (Na2) suivante :

30

CAGCCAGTTG GGATTAATAC TTCAACTACC TGCTGCTACA  
   GATTTATCAA TAAGAAAATC CCTAAGCAGA GGCTGGAGAG  
   CTACAGAAGG ACCACCAGTA GCCACTGTCC CCGGGAAGCT  
   GTAATCTTCA AGACCAAACCT GGACAAGGAG ATCTGTGCTG  
   ACCCACACA GAAGTGGGTC CAGGACTTTA TGAAGCACCT  
   GGACAAGAAA ACCCAAACCT CAAAGCTT

L'invention concerne également un vecteur d'expression qui porte, avec les moyens nécessaires à son expression, l'ADN recombinant défini précédemment.

5 Pour une expression dans les micro-organismes procaryotes, en particulier dans Escherichia coli, l'ADN recombinant doit être inséré dans un vecteur d'expression comportant notamment un promoteur efficace, suivi d'un site de fixation des ribosomes en amont du gène à exprimer, ainsi qu'une séquence d'arrêt de transcription efficace en aval du gène à exprimer. Ce vecteur doit également comporter une origine de réplication et un marqueur de  
10 sélection. Toutes ces séquences doivent être choisies en fonction de la cellule hôte.

Pour une expression dans les cellules eucaryotes, le vecteur d'expression selon l'invention porte l'ADN recombinant défini précédemment avec les moyens nécessaires à son expression, ainsi qu'éventuellement les moyens  
15 nécessaires à sa réplication dans les cellules eucaryotes et/ou à la sélection des cellules transformées. De préférence, ce vecteur porte un marqueur de sélection, choisi par exemple pour compléter une mutation des cellules eucaryotes réceptrices, qui permet la sélection des cellules qui ont intégré l'ADN recombinant en un nombre de copies élevé soit dans leur génome, soit  
20 dans un vecteur multicopie.

Pour une expression dans les cellules eucaryotes telles que la levure, par exemple Saccharomyces cerevisiae, il convient d'insérer l'ADN recombinant entre, d'une part, des séquences reconnues comme promoteur efficace, d'autre part, un terminateur de transcription. L'ensemble promoteur-séquence  
25 codante-terminateur, appelé cassette d'expression, est cloné soit dans un vecteur plasmidique monocopie ou polycopie pour la levure, soit intégré en multicopie dans le génome de la levure.

L'invention concerne aussi la levure qui contient, avec les moyens nécessaires à son expression, l'ADN recombinant défini précédemment.

30 L'invention a également trait à un procédé de préparation de la protéine ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de culture de cette levure, suivie de l'isolement et de la purification de la protéine recombinante.

Pour une expression dans les cellules eucaryotes telles que celles des champignons filamenteux, du groupe des ascomycètes, par exemple ceux des  
35 genres Aspergillus, Neurospora, Podospora, Trichoderma ou Cryphonectria, le

vecteur d'expression selon l'invention porte l'ADN recombinant défini précédemment avec les moyens nécessaires à son expression, et éventuellement un marqueur de sélection et/ou des séquences télomériques. Il est en effet possible de sélectionner les transformants ayant intégré un ADN d'intérêt à l'aide d'un marqueur de sélection situé soit sur le même vecteur que l'ADN d'intérêt, soit sur un autre vecteur, ces deux vecteurs étant alors introduits par cotransformation. L'ADN recombinant de l'invention peut être soit intégré au génome des champignons filamenteux, soit conservé sous forme extrachromosomique grâce à des séquences permettant la réplication et la partition de cet ADN.

Pour une expression dans les cellules animales, notamment dans les cellules d'ovaires de hamster chinois CHO, l'ADN recombinant est de préférence inséré dans un plasmide (par exemple dérivé du pBR322) comportant soit une seule unité d'expression dans laquelle est inséré l'ADN recombinant de l'invention et éventuellement un marqueur de sélection, devant un promoteur efficace, soit deux unités d'expression. La première unité d'expression comporte l'ADN recombinant ci-dessus, précédé d'un promoteur efficace (par exemple le promoteur précoce de SV40). La séquence autour de l'ATG d'initiation est de préférence choisie en fonction de la séquence consensus décrite par KOZAK (M. KOZAK (1978) Cell., 15, 1109-1123). Une séquence intronique, par exemple de l'intron de l' $\alpha$ -globine de souris, peut être insérée en amont de l'ADN recombinant ainsi qu'une séquence comportant un site de polyadénylation, par exemple une séquence de polyadénylation du SV40, en aval du gène recombinant. La deuxième unité d'expression comporte un marqueur de sélection, par exemple une séquence d'ADN codant pour la dihydrofolate réductase (enzyme ci-après abrégée DHFR). Le plasmide est transfecté dans les cellules animales, par exemple les cellules CHO dhfr<sup>-</sup> (incapables d'exprimer la DHFR). Une lignée est sélectionnée pour sa résistance au méthotrexate : elle a intégré dans son génome un nombre élevé de copies de l'ADN recombinant et exprime ce dernier à un niveau suffisant.

L'invention a également trait aux cellules animales contenant, avec les moyens nécessaires à son expression, cet ADN recombinant. Ce dernier peut, par exemple, avoir été introduit dans les cellules par transfection par le vecteur d'expression ci-dessus, par infection au moyen d'un virus ou d'un rétro-virus le portant, ou par microinjection. Des cellules animales préférées sont des cellules

CHO, en particulier les cellules CHO dhfr<sup>-</sup> à partir desquelles il est possible d'obtenir des lignées hautement productrices en la protéine de l'invention. Les cellules COS constituent également un hôte avantageux pour l'obtention de cette protéine.

5 L'invention concerne aussi un procédé de préparation de la protéine définie précédemment qui comprend une étape de culture des cellules animales ci-dessus, suivie de l'isolement et de la purification de la protéine recombinante.

10 L'invention se rapporte également à la protéine recombinante susceptible d'être obtenue par un procédé qui comprend une étape de culture de ces cellules animales, suivie de l'isolement et de la purification de la protéine recombinante.

15 La protéine de l'invention est une cytokine possédant une activité chimiotactique vis-à-vis des monocytes, cellules qui peuvent inhiber la croissance des tumeurs (B.J. Rollins et al, 1991, Molecular and Cellular Biology, 11, 6, 3125-3131) et éliminer certains parasites tels que Leishmania major (S. Stenger et al, 1991, Eur. J. Immunol., 21, 327-33).

20 L'invention a donc également pour objet le médicament, utile notamment en cancérologie et dans le traitement de certains états infectieux, au cours desquels les défenses immunitaires sont affaiblies, suite par exemple à la présence de certains parasites (par exemple la leishmaniose, la lèpre ou le shagas), qui contient comme principe actif la protéine ou le peptide définis précédemment dans un excipient pharmaceutiquement acceptable. Ceux-ci peuvent être utilisés seuls ou en association avec d'autres agents actifs : par  
25 exemple une ou plusieurs autres cytokines.

L'invention sera mieux comprise à l'aide de l'exposé ci-après, divisé en sections, qui comprend des résultats expérimentaux et une discussion de ceux-ci. Certaines de ces sections concernent des expériences effectuées dans le but de réaliser l'invention, d'autres des exemples de réalisation de l'invention  
30 donnés bien sûr à titre purement illustratif.

Une grande partie de l'ensemble des techniques ci-après, bien connues de l'homme de l'art, est exposée en détail dans l'ouvrage de Sambrook et al : "Molecular cloning : a Laboratory manual" publié en 1989 par les éditions Cold Spring Harbor Press à New-York (2ème édition).

La description ci-après sera mieux comprises à l'aide des figures 1a, 1b, 2 à 5, 6a, 6b et 6c.

La figure 1a, représente une carte d'assemblage du plasmide pSE1, plasmide de clonage dans E. coli et d'expression dans les cellules animales, les sites ayant disparu par ligation étant notés entre parenthèses. Les symboles utilisés dans cette figure seront précisés lors de la description de ce plasmide (section 2).

La figure 1b représente la séquence du fragment synthétique "site liant à HindIII"-HindIII utilisé dans l'assemblage du plasmide pSE1.

La figure 2 représente la séquence nucléotidique de l'ADNc NC28 et en vis-à-vis la séquence d'acides aminés déduite, les trois Met susceptibles d'initier la traduction étant soulignés, le site de clivage probable du peptide signal étant indiqué par un trait vertical et le site potentiel de N-glycosylation étant souligné en pointillés.

La figure 3 et la figure 4 représentent respectivement l'alignement d'après l'homologie maximale selon la méthode de Needleman et Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48, 443-453 de la séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc NC28 (ligne supérieure) et de la séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc de la cytokine MCP-1 (ligne inférieure) et l'alignement selon cette méthode de l'ADNc NC28 (ligne supérieure) et de l'ADNc de la cytokine MCP-1 (ligne inférieure).

La figure 5 représente la séquence du fragment B utilisé dans la construction du plasmide pEMR617, vecteur d'expression dans la levure.

Les figures 6a, 6b et 6c sont relatives aux expériences de mise en évidence de l'activité chimiotactique.

La figure 6a représente le nombre de cellules par champ microscopique en fonction de la concentration exprimée, en nM pour la protéine NC28 purifiée issue de la levure, la protéine NC28 purifiée issue de cellules COS, les peptides C13, C16, C20 et fMLP.

La figure 6b représente le nombre de cellules par champ microscopique en fonction de la concentration exprimée en ng/ml pour la protéine NC28 purifiée issue de levure et la cytokine MCP-1 purifiée issue des cellules COS.

La figure 6c représente le nombre de cellules par champ microscopique en fonction de la concentration exprimée en ng/ml, pour la protéine NC28 purifiée issue de levure, la cytokine IL-8 et le peptide fMLP.

**SECTION 1 : Culture et stimulation à l'aide de PMA et PHA-P des cellules mononucléaires du sang périphérique. Préparation de l'ARN messager utilisé pour faire la banque d'ADN complémentaire**

5    1) Culture et stimulation des cellules mononucléaires du sang périphérique :

          A partir de poches de sang périphérique (prélevées sur trois volontaires sains dans un centre de transfusion sanguine), ayant préalablement subi une cytophérèse et un gradient de Ficoll (Gauchat et al, 1989, Eur. J. Imm. 19, 1079) on prélève une fraction de cellules enrichie en cellules mononucléaires du sang périphérique PBMNC (peripheral blood mononuclear cells) de composition approximative suivante : 70 % de lymphocytes, 25 % de monocytes et 5 % de granulocytes (comptage des cellules à l'aide du compteur de cellules Coulter-Modèle S-Plus IV)

15        Les cellules sont recueillies dans un flacon de 250 ml, puis centrifugées pendant 10 min à 37°C. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est rincé avec 50 ml de milieu à base de glucose, sels minéraux, acides aminés et vitamines, appelé milieu RPMI (milieu RPMI 1640 de Gibco BRL), puis de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions.

20        Le culot de cellules est alors repris avec 500 ml du milieu RPMI complété avec 10 % de sérum de veau foetal (Gibco BRL- réf. 013-06290H), additionné de 10 unités de pénicilline et de 10 µg de streptomycine (solution de pénicilline/streptomycine de Gibco réf. 043-05140D) par ml de milieu ainsi que de L-glutamine (Gibco BRL-réf. 043-05030D) jusqu'à 2mM final.

25        Une partie de la suspension cellulaire est répartie en vue de la séparation des cellules adhérentes et des cellules non adhérentes, à raison d'environ 100 ml par boîte, dans quatre grandes boîtes de culture carrées (245 x 245 x 20 mm-Nunc - réf. 166508) et incubée pendant 1 h à 37°C. On sait en effet que la plupart des cellules monocytaires adhèrent à la boîte de culture

30        tandis que la plupart des cellules lymphocytaires restent en suspension.

          Les cellules non adhérentes sont aspirées à l'aide d'une pipette et cultivées dans des flacons de culture du type Falcon de surface 175 cm<sup>2</sup> en présence de milieu RPMI complété comme décrit ci-dessus, additionné de 10 ng/ml de phorbol myristate-2 acétate-3 (PMA) (Sigma-réf. P8139) et de

5  $\mu\text{g/ml}$  de phytohémaglutinine (PHA-P) (Sigma-réf. L8754), à 37°C en présence de 5 % de  $\text{CO}_2$  pendant 24 h.

Sur les cellules adhérentes on rajoute 100 ml de milieu RPMI complété comme décrit ci-dessus additionné de 10 ng/ml de PMA et de 5  
5  $\mu\text{g/ml}$  de PHA-P. Les cellules sont incubées à 37°C en présence de 5 % (v/v) de  $\text{CO}_2$  pendant 5 h.

Le reste de la suspension cellulaire, appelé ci-après les cellules totales, est réparti dans 4 grandes boîtes de culture carrées et incubé en présence de milieu RPMI complété comme décrit ci-dessus, additionné de  
10 10 ng/ml de PMA et 5  $\mu\text{g/ml}$  de PHA-P à 37°C en présence de 5 % (v/v) de  $\text{CO}_2$  pendant 5 h pour les deux premières boîtes et 24 h pour les deux autres.

2 h environ avant la fin de l'incubation on ajoute dans le milieu de culture de ces différentes cellules 10  $\mu\text{g/ml}$  de cycloheximide (Sigma réf.C6255) (inhibiteur de traduction qui augmente la stabilité des ARN des  
15 cytokines : cf. Lindsten et al, 1989, Science 244, 339-344) et l'incubation est poursuivie pendant 2 h à 37°C.

## 2) Préparation de l'ARN messager :

### 20 a) Extraction de l'ARN messager

Les cellules sont récupérées de la façon suivante :

- les cellules adhérentes sont lavées 2 fois avec du tampon PBS (Phosphate buffered saline réf. 04104040-Gibco BRL) puis grattées avec un grattoir en  
25 caoutchouc et centrifugées. On obtient ainsi un culot cellulaire, appelé culot A.

- pour les cellules non adhérentes, après agitation du flacon contenant la suspension des cellules, la suspension cellulaire est prélevée et centrifugée. On obtient ainsi un culot cellulaire, appelé culot cellulaire NA.

- pour les cellules totales, la fraction adhérente est lavée 2 fois avec du tampon PBS et grattée comme précédemment puis centrifugée. La fraction non adhérente est centrifugée. Les deux culots cellulaires obtenus seront réunis par la suite. Leur réunion est appelée culot cellulaire T(5 h) pour les  
30 cellules totales incubées pendant 5 h et T(24 h) pour les cellules totales incubées pendant 24 h.  
35

Les culots cellulaires A, NA, T(5 h) et T(24 h) sont congelés et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Chaque culot cellulaire congelé est mis en suspension dans le tampon de lyse de composition suivante : guanidine- thiocyanate 5M ; Tris-  
5 (hydroxyméthyl)-aminométhane 50mM pH 7,5 EDTA 10mM. La suspension est soniquée à l'aide d'un sonicateur Ultra Turax n° 231 256 (Janke et Kunkel) à puissance maximale pendant 4 cycles de 20 s. On ajoute du  $\beta$ -mercaptoéthanol jusqu'à 0,2M et on refait un cycle de sonication de 30 s. On ajoute du chlorure de lithium jusqu'à 3M. On refroidit la suspension à  $4^{\circ}\text{C}$   
10 et on la laisse reposer à cette température pendant 48 h. L'ARN est ensuite isolé par centrifugation pendant 60 min. Le culot d'ARN est lavé une fois avec une solution de chlorure de lithium 3M, recentrifugé, puis repris dans un tampon de composition suivante : SDS 1 %, EDTA 5mM et Tris HCl 10mM pH 7,5, additionné de 1 mg/ml de protéinase K (Boehringer Mannheim,  
15 GmbH). Après incubation à  $40^{\circ}\text{C}$  pendant 1 h la solution d'ARN est extraite avec un mélange phénol/chloroforme. On précipite à  $-20^{\circ}\text{C}$  l'ARN contenu dans la phase aqueuse à l'aide d'une solution d'acétate d'ammonium 0,3M final et 2,5 volumes d'éthanol. On centrifuge à 15 000 g pendant 30 min et on garde le culot.

20

#### b) Purification de la fraction poly A<sup>+</sup> de l'ARN

Le culot est repris dans 1 ml de tampon de composition Tris-HCl 10mM pH 7,5 EDTA 1mM, appelé tampon TE et mis en suspension par  
25 agitation au vortex. L'oligo dT-cellulose type 3 (commercialisé par Collaborative Research Inc, Biomedicals Product Division) est préparé suivant les recommandations du fabricant. L'ARN est déposé sur l'oligo dT-cellulose, agité doucement pour mettre en suspension les billes, puis chauffé pendant 1 min à  $65^{\circ}\text{C}$ .

30 La suspension est ajustée à 0,5 M NaCl, puis mise à agiter doucement pendant 10 min. La suspension est alors centrifugée pendant 1 min à 1000 g, le surnageant est éliminé, le culot est lavé 2 fois avec 1 ml de tampon TE contenant 0,5 M NaCl. Les surnageants sont éliminés. L'élution de la fraction polyadénylée des ARN (constituée des ARN messagers) est obtenue par  
35 suspension des billes dans 1 ml de tampon TE, puis chauffage de cette



suspension à 60°C pendant 1 min, suivie d'une agitation pendant 10 min sur plaque basculante. On centrifuge ensuite pendant 1 min à 1000 g, ce qui permet de récupérer le surnageant contenant des ARN messagers libres en solution. L'ensemble des opérations ci-dessus (à partir de l'élution) est répété

5 2 fois. Les surnageants ainsi obtenus sont rassemblés, on élimine les billes résiduelles par centrifugation et on précipite le surnageant avec 3 volumes d'éthanol et une solution de NaCl à 0,3M final.

On obtient ainsi à partir des culots cellulaires A, NA, T(5 h) et T(24 h), quatre échantillons d'ARN-poly A<sup>+</sup>, nommés par la suite ARN-poly

10 A<sup>+</sup>-A, ARN-poly A<sup>+</sup>-NA; ARN-poly A<sup>+</sup>-T(5 h) et ARN-poly A<sup>+</sup>-T(24 h).

15 **SECTION 2 : Préparation d'une banque d'ADN complémentaire enrichie en séquences spécifiques des cellules mononucléaires du sang périphérique**

**1) Construction du vecteur de clonage pSE1 :**

20 La stratégie mise en oeuvre fait appel à des fragments obtenus à partir de plasmides préexistants accessibles au public et à des fragments préparés par voie de synthèse selon les techniques maintenant couramment utilisées. Les techniques de clonage employées sont celles décrites par T. Maniatis, EF. Fritsch et J. Sambrook dans "Molecular Cloning, a Laboratory manual" (Cold


25 Spring Harbor Laboratory, 1984). La synthèse des oligonucléotides est réalisée à l'aide d'un synthétiseur d'ADN Biossearch 8700.


La description ci-après sera mieux comprise en référence à la figure 1<sub>a</sub>.

30 Ce plasmide a été construit par ligations successives des éléments suivants :


a)- un fragment PvuII-PvuII - symbolisé par ++++++ sur la figure 1<sub>a</sub> - de 2525pb, obtenu par digestion complète du plasmide pTZ18R (Pharmacia) à l'aide de l'enzyme de restriction PvuII. Ce fragment contient l'origine de

réplication du phage f1 (notée ORI F1 sur la figure 1<sub>a</sub>), un gène (noté Amp<sup>R</sup> sur la figure 1<sub>a</sub>) portant la résistance à l'ampicilline et l'origine de réplication (notée ORI pBR322 sur la figure 1<sub>a</sub>) permettant la réplication de ce plasmide dans E. coli. Le premier site franc PvuII disparaît par ligation avec le site franc  
5 EcoRV (qui disparaît également) du fragment décrit en g).

b)- un fragment PvuII-HpaI - symbolisé par  sur la figure 1<sub>a</sub> - de 1060 pb de l'ADN d'adénovirus type 5 entre les positions 11299 (site de restriction PvuII) et 10239 (site de restriction HpaI) (Dekker et Van Ormondt, Gene 27, 1984, 115-120) contenant l'information pour les ARN VA-I et  
10 VA-II. Le site franc HpaI disparaît par ligation avec le site franc PvuII (qui disparaît également) du fragment décrit en c). Le site ApaI en position 11 218 a été enlevé par clivage à l'aide de l'enzyme ApaI, traitement à l'aide de l'exonucléase : ADN polymérase du phage T4 et religation.

15 c)- un fragment PvuII-HindIII - symbolisé par  sur la figure 1<sub>a</sub> - de 344 pb, issu de l'ADN du virus SV40 obtenu par digestion complète à l'aide des enzymes de restriction PvuII et HindIII. Ce fragment comporte l'origine de réplication et le promoteur précoce de l'ADN du virus SV40 (réf. B.J. Byrne et al. Proc. Ntl. Acad. Sci. USA (1983), 80, 721-725).  
20

Le site HindIII disparaît par ligation avec le site liant à HindIII du fragment décrit en d).

d)- un fragment synthétique "site liant à HindIII" - HindIII - symbolisé par  sur la figure 1<sub>a</sub> - de 419 pb dont la séquence, donnée sur la figure 1<sub>b</sub>, contient une séquence proche de la séquence 5' non traduite du virus HTLV1 (R. WEISS et al, "Molecular Biology of Tumor Viruses" - part 2-2<sup>e</sup>  
25 ed - 1985 - Cold Spring Harbor Laboratory - p. 1057) et l'intron distal du gène de l'α-globine de souris (Y. Nishioka et al, 1979, Cell, 18, 875-882).

30 e)- un fragment synthétique HindIII-"site liant à BamHI" - symbolisé par XXXXXXXX sur la figure 1<sub>a</sub> - contenant le promoteur de l'ARN-polymérase du phage T7 ainsi qu'un polylinker contenant notamment les sites de clonage ApaI et BamHI

35

- 17 -

ApaI


AGCTTGTCTGACTAATACGACTCACTATAGGGCGGCCGCGGGCCCCCT

ACAGCTGATTATGCTGAGTGATATCCCGCCGGCGCCCGGGGA

HindIII      BamHI      site liant à BamHI

GCAGGAATTTCGGATCCCCCGGGTGACTGACT

5 CGTCCTTAAGCCTAGGGGGCCCACTGACTGACTAG

- f)- un fragment BamHI-BclI de 240 pb - représenté par  sur la figure 1<sub>a</sub> -, petit fragment obtenu par digestion complète à l'aide des enzymes BclI et BamHI de l'ADN du virus SV40 qui contient le site de polyadénylation tardif de ce dernier. (M. Fitzgerald et al. Cell, 24, 1981, 251-260). Les sites BamHI et BclI disparaissent par ligations avec respectivement le "site liant à BamHI" du fragment décrit en e) et le site BamHI (qui disparaît également) du fragment décrit en g).
- 15 g)- un fragment BamHI-EcoRV - symbolisé par OOOOOO sur la figure 1<sub>a</sub> - de 190 pb, petit fragment issu du plasmide pBR322 après digestion complète à l'aide des enzymes EcoRV et BamHI.

Le plasmide pSE1 comporte donc les éléments nécessaires pour son utilisation comme vecteur de clonage dans E. coli (origine de replication dans E. coli et gène de résistance à l'ampicilline, provenant du plasmide pTZ18R) ainsi que comme vecteur d'expression dans les cellules animales (promoteur, intron, site de polyadénylation, origine de replication du virus SV40), et pour sa copie en simple brin dans un but de séquençage (origine de réplication du phage f1).

20

25

2) Constitution d'une banque d'ADN complémentaire enrichie en séquences spécifiques des cellules mononucléaires du sang périphérique :

30 La technique de clonage utilisée est celle décrite par Caput et al, (technique de l'amorce-adaptateur (Primer-adapter) : Caput et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 1986, 83, 1670-1674).

Elle consiste d'une part à digérer le vecteur pSE1 par ApaI, ajouter une queue de polydC sur l'extrémité 3' protubérante, puis à digérer les plasmides ainsi obtenus par l'endonucléase BamHI. Le fragment

35

correspondant au vecteur est purifié sur colonne de Sépharose CL4B (Pharmacia). Il comprend donc une queue polydC à une extrémité, l'autre extrémité étant cohésive, du type BamHI.

5 D'autre part, les ARN polyA<sup>+</sup> obtenus à l'issue de la section 1 sont soumis à la transcription inverse à partir d'une amorce dont la séquence est la suivante :

5' GATCCGGGCCCCTTTTTTTTTTT 3'

10 Ainsi, les ADNc présentent à leur extrémité 5' la séquence GATCC complémentaire de l'extrémité cohésive BamHI.

Les hybrides ARN-ADN obtenus par action de la transcriptase inverse sont soumis à une hydrolyse alcaline qui permet de se débarrasser de l'ARN. Les ADNc simple brin sont alors soumis à un traitement à la terminale  
15 transférase, de façon à ajouter des polydG en 3' et purifiés par 2 cycles sur colonne de sépharose CL4B.

Ces ADNc sont hybridés avec de l'ARN-polyA<sup>+</sup> provenant de cellules de la lignée COS3 (lignée de cellules de reins de singe exprimant l'antigène T du virus SV40 : cf. Y. Gluzman, 1981, Cell, 23, 175-182)  
20 préparées comme décrit dans la Section 1.2).

Les ADNc non hybridés sont isolés (fraction enrichie en ADN complémentaire aux ARN messagers spécifiques des cellules mononucléaires du sang périphérique).

Ces ADNc sont insérés sous forme simple brin dans le vecteur pSE1.  
25 Un second oligonucléotide (l'adaptateur) complémentaire de l'amorce est nécessaire pour générer un site BamHI à l'extrémité 5' des ADNc. Après hybridation du vecteur, de l'ADNc et de l'adaptateur, les molécules recombinantes sont circularisées par l'action de la ligase du phage T4. Les régions simple brin sont alors réparées grâce à l'ADN polymérase du phage  
30 T4. Le pool de plasmides ainsi obtenu sert à transformer la souche E. coli MC 1061 (Casabadan et S. Cohen, J. Bact. (1980) 143, 971-980) par électroporation.

Protocole de préparation de la banque d'ADN complémentaire

## a) Préparation de l'ADN complémentaire

- 5 A partir de 5  $\mu$ g des ARN-poly A<sup>+</sup> de cellules mononucléaires de sang périphérique obtenus à l'issue de la section 1 de composition suivante : ARN-poly A<sup>+</sup> A : 0,5  $\mu$ g, ARN-poly A<sup>+</sup> NA : 2  $\mu$ g, ARN-poly A<sup>+</sup> T(5 h) : 2  $\mu$ g et ARN-poly A<sup>+</sup> T(24 h) : 0,5  $\mu$ g, on prépare l'ADN complémentaire simple-brin marqué au <sup>32</sup>P-dCTP (l'ADN complémentaire obtenu présente  
10 une activité spécifique de 3000 dpm/ng) avec l'amorce synthétique de séquence suivante (comportant un site BamHI) :

5' GATCCGGGCCCTTTT TTTT TTTT 3'

- 15 dans un volume de 100  $\mu$ l. Après 30 min d'incubation à 46°C avec 100 unités de l'enzyme transcriptase inverse (Genofit-E1 022) on ajoute 4  $\mu$ l d'EDTA 0,5M. On extrait une première fois avec du phénol (saturé en tampon TE) puis une seconde fois avec du chloroforme. On ajoute 10  $\mu$ g d'ARN de transfert de foie de veau, 1/10ème de volume d'une solution d'acétate d'ammonium 10M et 2,5 volumes d'éthanol pour précipiter l'ADN complémentaire. On centrifuge, on dissout le culot dans 30  $\mu$ l de tampon TE puis on retire les petites  
20 molécules telles que sels, phénol et chloroforme par chromatographie d'exclusion sur une colonne de polyacrylamide P10 (Biogel P10-200-400mesh, réf. 1501050-Biorad).

## b) Hydrolyse alcaline de la matrice ARN

- 25 On ajoute 4,6  $\mu$ l d'une solution de NaOH 2N, on incube pendant 30 min à 68°C, puis on ajoute 4,6  $\mu$ l d'acide acétique 2N et on fait passer la solution obtenue sur une colonne de polyacrylamide P10.

## 30 c) Addition homopolymérique de dG

- On allonge l'ADN complémentaire en 3' avec une "queue" de dG avec 66 unités de l'enzyme terminale transférase (Pharmacia 27073001). On incube pendant 30 min à 37°C, puis on ajoute 4  $\mu$ l d'EDTA 0,5M.

35

## d) Purification sur colonne de sépharose CL4B

Afin d'éliminer l'amorce synthétique, on purifie l'ADN complémentaire sur deux colonnes successives de 1 ml de sépharose CL4B (Pharmacia), équilibrées avec une solution NaOH 30mM/EDTA 2mM.

Les trois premières fractions radioactives (d'environ 80  $\mu$ l chacune) sont regroupées et précipitées avec 1/10<sup>ème</sup> de volume d'une solution d'acétate d'ammonium et 2,5 volumes d'éthanol. La quantité d'ADN complémentaire est de 1  $\mu$ g.

## e) Hybridation

Le culot d'ADN complémentaire est mis en suspension dans 25  $\mu$ l de tampon TE, on ajoute 15  $\mu$ g d'ARN-polyA<sup>+</sup> extrait de cellules de la lignée COS, puis 1/10<sup>ème</sup> de volume d'une solution de NaCl 3M, 2,5 volumes d'éthanol et on laisse précipiter à -20°C.

On centrifuge, on lave à l'éthanol 70 %, on sèche, on dissout le culot dans 5  $\mu$ l de tampon de composition suivante : Tris-HCl 0,1M pH 7,5 ; NaCl 0,3M, EDTA 1mM, on met la solution obtenue dans un tube capillaire que l'on scelle, puis on incube à 65°C pendant 40 h.

On dilue le contenu du capillaire dans 100  $\mu$ l de tampon TE auquel on ajoute 300  $\mu$ l de tampon phosphate de sodium 50mM pH6,8. On fait passer la solution obtenue sur une colonne d'hydroxyapatite (Biorad réf. 130.0520) à 60°C, équilibrée avec ce tampon phosphate. On sépare le simple brin (l'ADN complémentaire non-hybridé) et le double brin (ARN messenger de COS hybridé à l'ADN complémentaire) par un gradient de tampon phosphate de 0,1M à 0,2M à travers la colonne d'hydroxyapatite. On regroupe les fractions correspondant à l'ADN complémentaire simple brin (25 % en poids de l'ADNc élué, ce qui correspond à un enrichissement d'environ 4 fois en séquences spécifiques de cellules mononucléaires du sang périphérique), on ajoute 20  $\mu$ g d'ARN de transfert, on précipite le volume total avec 1/10<sup>ème</sup> de volume d'une solution d'acétate d'ammonium 10M et 2,5 volumes d'éthanol. On centrifuge, le culot est dissout dans 200  $\mu$ l de TE, on retire le phosphate résiduel sur polyacrylamide P10, on précipite de nouveau avec 1/10<sup>ème</sup> de volume d'une solution d'acétate d'ammonium 10M et 2,5 volumes d'éthanol.

- 21 -

Le culot est dissous dans 30  $\mu$ l d'une solution de NaOH 30mM ; EDTA 2mM. On charge l'ADN complémentaire sur une colonne de sépharose CL4B (Pharmacia) de 1 ml, équilibrée avec une solution de NaOH 30mM ; EDTA 2mM, afin d'éliminer le reste d'amorce synthétique. On regroupe les 3  
5 premières fractions radioactives d'environ 80  $\mu$ l chacune. On précipite l'ADNc contenu dans ces fractions avec 1/10<sup>ème</sup> de volume d'une solution d'acétate d'ammonium 10 M et 2,5 volume d'éthanol. La quantité d'ADN complémentaire ainsi récupérée est de 20 ng.

10 f) Appariement du vecteur de clonage pSE1 et de l'ADN complémentaire en présence de l'adaptateur

On centrifuge, le culot est dissous dans 33  $\mu$ l de tampon TE, on ajoute 5  $\mu$ l (125 ng) de vecteur de clonage pSE1, 1  $\mu$ l (120 ng) de l'adaptateur de  
15 séquence suivante (comprenant un site ApaI) :

5' AAAAAAAAAAAAAAGGGCCCG 3'

10  $\mu$ l d'une solution de NaCl 200mM, on incube 5 min à 65°C puis on laisse  
20 refroidir le mélange réactionnel jusqu'à température ambiante.

#### g) Ligation

On ligue le vecteur de clonage et l'ADNc simple brin dans un volume  
25 de 100  $\mu$ l avec 32,5 unités de l'enzyme ADN ligase du phage T4 (Pharmacia ref : 270 87002) pendant une nuit à 15°C.

#### h) Synthèse du deuxième brin de l'ADNc

30 On élimine les protéines par extraction au phénol suivie d'une extraction au chloroforme, puis on ajoute 1/10<sup>ème</sup> de volume d'une solution d'acétate d'ammonium 10 mM, puis 2,5 volumes d'éthanol. On centrifuge, le culot est dissous dans le tampon de composition Tris acétate pH 7,9, 33 mM, acétate de potassium 62,5 mM, acétate de magnésium 1 mM et dithiothreitol  
35 (DTT) 1 mM. Le deuxième brin d'ADN complémentaire est synthétisé dans un

volume de 30  $\mu$ l avec 30 unités de l'enzyme ADN polymérase du phage T4 (Pharmacia : réf. 27-0718) et un mélange des quatre déoxynucléotides triphosphates dATP, dCTP, dGTP et dTTP, ainsi que deux unités de la protéine du gène 32 du phage T4 (Pharmacia : réf. 27-0213), pendant 1 h à 5 37°C. On extrait au phénol et on retire les traces de phénol par une colonne de polyacrylamide P10 (Biogel P10-200-400 mesh- Réf 15011050 - Biorad).

i) Transformation par électroporation

10 On transforme des cellules E. coli MC1061 (Clontech) avec l'ADN recombinant obtenu précédemment par électroporation à l'aide de l'appareil Biorad Gene Pulser (Biorad) utilisé à 2,5 kV dans les conditions prescrites par le fabricant, puis on fait pousser les bactéries pendant 6 h 30 dans du milieu dit milieu LB (Sambrook, op cité) de composition : bactotryptone 10 g/l ; 15 extrait de levure 5 g/l ; NaCl 10 g/l, additionné de 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline.

On détermine le nombre de clones indépendants en étalant une dilution au 1/1000<sup>ème</sup> de la transformation avant l'amplification sur une boîte de milieu LB additionné de 1,5 % d'agar (p/v) et de 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline, appelé par la suite milieu LB gélosé. Le nombre de clones indépendants est de 20 500 000.

**SECTION 3 : Criblage de la banque d'ADN complémentaire soustraite et sélection du clone NC28**

25

1) Réalisation des répliques des colonies bactériennes de la banque d'ADNc sur filtre de nylon :

30 On distribue environ 40 000 bactéries recombinantes de la banque d'ADNc sur des boîtes de Pétri de (245 x 245) mm contenant du milieu LB gélosé (environ 2000 colonies/boîte).

A partir de chacune de ces boîtes, on réalise un transfert des colonies sur une membrane de nylon (Hybond N-Amersham) par dépôt de la membrane sur la surface de la boîte et mise de repères par perçage de la 35 membrane à l'aide d'une aiguille. La membrane est ensuite retirée et déposée



sur la surface d'une nouvelle boîte de Pétri contenant du milieu LB gélosé. On laisse pendant quelques heures à 37°C pour obtenir la repousse des colonies. A partir de cette première membrane on réalise deux répliques sur de nouvelles membranes (préalablement déposées sur du milieu LB gélosé pour les humidifier) par contacts successifs avec la première membrane. Les répliques sur membrane obtenues sont finalement déposées sur des boîtes de milieu LB gélosé et mises à incuber pendant une nuit à 30°C.

Les répliques sur membrane sont déposées avec les colonies vers le haut, sur une feuille de Whatman 3MM saturée avec une solution de composition : NaOH 0,5M ; NaCl 1,5M, pendant 5 min, ce qui permet de lyser les bactéries et de fixer l'ADN. Les répliques sur membrane sont ensuite posées sur une deuxième feuille de Whatman 3MM, saturée cette fois avec une solution neutralisante de composition : NaCl 1,5M ; Tris-HCl pH8 0,5M, pendant 5 min. Les répliques sur membrane sont ensuite plongées dans une solution de 2 x SSC (composition de la solution SSC : NaCl 0,15M ; citrate de sodium 0,015M) et les débris bactériens sont partiellement éliminés en frottant doucement à l'aide d'ouate de nettoyage.

On traite ensuite les répliques sur membrane avec de la protéinase K (Boehringer Mannheim GmbH) à 100 µg/ml dans une solution de composition : Tris-HCl 10mM pH8 ; EDTA 10mM ; NaCl 50mM ; SDS 0,1 % à raison de 20 ml par membrane. On incube pendant 30 min à 37°C avec agitation. Les répliques sur membrane sont de nouveau plongées dans une solution de 2 x SSC pour éliminer définitivement toute trace de débris bactériens. Elles sont finalement mises à sécher sur du papier filtre pendant quelques minutes puis pendant 30 min sous vide à + 80°C. On obtient ainsi, pour chaque boîte, deux répliques sur membrane, appelées par la suite réplique 1 et réplique 2.

## 2) Préparation de l'ARN utilisé pour la fabrication des sondes ADNc :

30

### a) Culture et stimulation de la lignée monocyttaire U937

La lignée monocyttaire U937 ATCC 1593 est cultivée dans du milieu RPMI complété avec 10 % de sérum de veau foetal (Gibco BRL-réf. 013-06290H), additionné de 10 unités de pénicilline et de 10 µg de streptomycine

35

par ml ainsi que de 2 mM final de L-glutamine. Pour l'activation de ces cellules, on les met dans le milieu RPMI additionné de pénicilline, streptomycine et de L-glutamine et de 20 ng/ml de phorbol myristate-2 acétate-3 (PMA) (Sigma-réf. P8139) pendant 24 h. Les cellules ainsi activées  
5 sont grattées et centrifugées. Le culot cellulaire obtenu est appelé culot cellulaire U937P.

La moitié des cellules est induite de surcroît avec du cycloheximide (10 µg/ml) pendant les deux dernières heures de culture. Cet inhibiteur de la  
10 synthèse protéique rend plus stables les ARN messagers instables (dont les cytokines) (cf. T. Lindsten et al., 1989, Science, 244, 339-343). Les cellules ainsi activées sont grattées et centrifugées. Le culot cellulaire obtenu est appelé culot cellulaire U937PC.

#### b) Préparation de l'ARN poly A<sup>+</sup>

15

A partir des culots cellulaires U937P et U937PC, l'ARN est extrait et la fraction polyA<sup>+</sup> est purifiée comme décrit dans la section 1-2) a) et b). On obtient ainsi deux fractions ARN-polyA<sup>+</sup>, appelées respectivement fraction polyA<sup>+</sup>1 et fraction polyA<sup>+</sup>2.

20

#### 3) Préparation des sondes ADNc radiomarquées :

Les sondes ADNc radiomarquées, appelées respectivement sonde 1 et sonde 2 sont synthétisées à partir des deux fractions ARN-polyA<sup>+</sup> ci-dessus,  
25 préparées comme décrit ci-après.

1 µg d'ARN polyA<sup>+</sup> est hybridé avec 200 ng d'oligo dT<sub>12-18</sub> (Pharmacia) dans 2 à 3 µl de tampon de composition Tris HCl, pH 7,5, 50 mM et EDTA 1 mM par incubation pendant 2 min à 65°C et refroidissement jusqu'à température ambiante. La synthèse de l'ADNc radiomarké est réalisée  
30 dans un volume réactionnel de 10 µl en tampon de composition : Tris-HCl 50mM pH8,3 ; MgCl<sub>2</sub> 5mM ; dithiotreitol 10mM, contenant 50 µM de dATP dGTP et dTTP, 10 µM de dCTP et 150 µCi de dCTP α32P (3000 Ci/ mmol Amersham) et 40 unités de RNAsine (inhibiteur de RNase-Genofit). La réaction s'effectue à 46°C pendant 30 min en présence de 10 à 20 unités de

transcriptase inverse (Genofit). Cette synthèse est suivie de l'hydrolyse alcaline de l'ARN par une solution de NaOH 0,3M dans un volume final de 20  $\mu$ l pendant 30 min à 65°C. On neutralise par ajout d'acide acétique 3M. On ajuste le volume à 50  $\mu$ l avec du milieu TE. On fait une extraction avec un même volume de phénol suivie d'une deuxième extraction avec un même volume d'un mélange chloroforme/isoamylalcool (dans les proportions respectives 24/1). On élimine le dCTP  $\alpha$ 32P non incorporé lors de la synthèse du brin ADNc par chromatographie d'exclusion sur une colonne de polyacrylamide P10 (Biogel-200-400 mesh-Biorad).

10 La quantité d'ADNc est de 60 à 100 ng possédant une activité spécifique de  $1 \times 10^9$  dpm/ $\mu$ g.

4) Hybridation des répliques des colonies bactériennes avec les sondes ADNc :

15

Les répliques sur membrane sont préhybridées pendant 2 h à 42°C dans un tampon de composition : 50 % formamide ; 6 x SSC ; 5 x solution de Denhardt ; 0,1 % SDS et 100  $\mu$ g/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué, rajouté après dénaturation pendant 10 min à 100°C. Les répliques sur membrane sont hybridées pendant deux jours : la réplique 1 avec la sonde 1 et la réplique 2 avec la sonde 2, ces sondes étant utilisées à une concentration de 4 ng/ml dans le tampon ci-dessus. La 5 x solution de Denhardt (cf. Sambrook, op. cité) a la composition : Ficoll (type 400-Pharmacia) 1 g/l, polyvinylpyrrolidone 1 g/l et la sérumalbumine bovine (BSA) 1 g/l.

25 Les préhybridation et hybridation s'effectuent en tubes dans un four à hybrider (Hybaid) avec respectivement 25 ml et 10 ml de tampon par membrane.

30 Ensuite les répliques sur membrane sont successivement lavées plusieurs fois pendant 15 min à 20°C dans le tampon de composition 2 x SSC ; 0,1 % SDS, puis deux fois pendant 15 min dans une solution 0,1 x SSC, 0,1 % SDS à 55°C, séchées sur papier Whatman 3MM et autoradiographiées sur films Kodak XAR5.

5) Hybridation avec un mélange d'oligonucléotides correspondant à la plupart des cytokines connues :

Pour identifier les clones qui contiennent les ADN complémentaires aux ARN messagers des cytokines connues, une autre série de répliques sur membrane, préparées comme décrit ci-dessus, est hybridée avec un mélange - appelé mélange C - de 28 oligonucléotides comportant chacun 20 nucléotides, correspondant aux ADN complémentaires des cytokines suivantes : Interleukine-1  $\alpha$  (Furutani Y. et al, 1985, Nucl. Ac. Res., 13, 5869-5882), Interleukine-1  $\beta$  (Auron P. et al, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7907-7911), Interleukine-2 (Degrove W. et al, 1983, EMBO J., 2, 3249-3253), Interleukine-3 (Yang Y.C. et al, 1986, 47, 3-10), Interleukine-4 (Yokoto T. et al, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 5894-5898), Interleukine-5 (Hirano T. et al, 1986, Nature, 324, 73-75), Interleukine-6 (May L. et al, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8957-8961), Interleukine-7 (Namen A. et al, 1988, Nature, 333, 571-573), Interleukine-8 (Matsushima K. et al, 1988, J. Exp. Med., 167, 1883-1893), Interleukine-9 (Yang Y.C. et al, 1989, Blood, 74, 1880-1884), TNF $\alpha$  (Pennica D. et al, 1984, Nature, 312, 724-729), TNF $\beta$  (Gray P. et al, 1984, Nature, 312, 721-724), G-CSF (Nagata S. et al, 1986, 319, 415-418), M-CSF (Kawasaki E. et al, 1985, Science, 230, 291-296), GM-CSF (Wong G. et al, 1985, Science, 228, 810-815), LIF (Grough N. et al, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2623-2627), Interféron  $\alpha$  (Goeddel D. et al, 1981, Nature, 290, 20-26), Interféron  $\beta$  (Taniguchi T. et al, 1980, Gene, 10, 11-15), Interféron  $\gamma$  (Gray P. et al, 1982, Nature, 295, 503-508), TGF $\alpha$  (Derynck R. et al, 1984, Cell, 38, 287-297), TGF $\beta$ 1 (Derynck R. et al, 1985, Nature, 316, 701-705), bFGF (Prats H. et al, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1836-1840), Erythropoïétine (Jacobs K. et al, 1985, Nature, 313, 806-810), BCGF (Sharma S. et al, 1987, Science, 235, 1489-1492), MIF (Weiser W. et al, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7522-7526), MCP-1 (Yoshimura T. et al, FEBS Lett., 244, 487-493), Oncostatine-M (Malik N. et al, 1989, Mol. Cell. Biol., 9, 2847-2853) et EDF (Murata M. et al, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2434-2438).

Ces oligonucléotides, fabriqués à l'aide du synthétiseur d'ADN Biosearch 8700, sont couplés avec de la peroxydase de raifort EC 1.11.17 (Boehringer Mannheim-Réf. 814-407) selon le protocole suivant :

- 27 -

- on fait réagir sur la colonne de synthèse les oligonucléotides avec du carbonyl-diimidazole (Aldrich - 11, 553-3) et du diamino-1,6-hexane (Aldrich - H1.169-6) selon la méthode de Wachter et al, 1986, Nucl. Ac. Res., 14, 7985-7994.

5       - après déprotection des bases et clivage du support par traitement ammoniacal les oligonucléotides sont purifiés sur une résine d'échange d'ions (Quiagen - Diagen-500051) avec changement du contre-ion ammonium en ion lithium.

10       - les 5'-amino-oligonucléotides sont couplés à la peroxydase de raifort (Boehringer Mannheim-814407) selon la méthode de M. Urdea et al, Nucl. Ac. Res., 1988, 16, 4937-4956.

Le mélange d'oligonucléotides s'hybride avec environ 10 % des clones de la banque.

15       Les clones donnant un signal autoradiographique plus fort avec la sonde 2 qu'avec la sonde 1, et ne s'hybridant pas avec le mélange C ont été partiellement séquencés comme décrit dans la section 4 ci-après. Un de ces clones, appelé clone A dans la demande de brevet FR 90 14 961 et désigné par clone NC28 dans la présente demande, a été retenu.

20

**SECTION 4 : Séquençage et analyse de la séquence de l'ADNc du clone NC28 :**

1) Séquençage de l'ADNc du clone NC28 :

25

a) préparation de l'ADN simple brin

Le clone NC28 contient le vecteur pSE1, lequel porte un ADNc entre les sites ApaI et BamHI, appelé par la suite ADNc NC28.

30       Le vecteur pSE1, qui contient l'origine de replication du phage f1 permet de produire de l'ADN simple brin par culture du clone NC28 en présence du bactériophage M13K07 (Pharmacia- réf : 27-1524) de la manière suivante :

35       Le clone NC28 est cultivé, dans un tube de 15 ml, sous agitation à 37°C dans 2 ml de milieu 2 x YT de composition : bactotryptone 16 g/l, extrait de

levure 10 g/l NaCl 5 g/l (décrit dans Sambrook et al, op cité), complémenté avec 0,001 % de thiamine et 100 µg/ml d'ampicilline jusqu'à une densité optique à 660 nm d'environ 0,60.

5 - 100 µl de cette culture sont infectés avec du bactériophage M13K07 (Pharmacia- réf : 27-1524) à une multiplicité d'infection de l'ordre de 10 dans un tube de 15 ml. La culture est mise à agiter à 37°C.

- Au bout de 1 h, 2 ml de milieu sont ajoutés. La culture est alors mise à incuber pendant environ 16 h à 37°C sous agitation.

10 - 1,5 ml de la culture est centrifugé, dans un microtube, à 15 000 g pendant 2 min.

- 1 ml de surnageant est transféré dans un microtube et additionné de 250 µl d'une solution de polyéthylène glycol (de masse moléculaire 6000) 20 % contenant 2,5M de NaCl. Le mélange est incubé pendant 5 min à 4°C pour faciliter la précipitation du phage puis centrifugé pendant 5 min à 15 000 g. Le  
15 surnageant est éliminé et le culot phagique est remis en suspension dans 500 µl de tampon de composition Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM.

- La suspension est extraite une fois au phénol saturé avec du Tris-HCl 100mM pH8, puis deux fois au chloroforme.

20 - La préparation est ensuite précipitée par adjonction de 1/10 de volume d'une solution d'acétate de sodium 3M pH4,8 et 2,5 volumes d'éthanol. La précipitation est réalisée à -20°C pendant un minimum de 20 min. L'ADN est centrifugé pendant 10 min à 15 000 g, le culot est lavé avec une solution d'éthanol à 70 % puis remis en suspension dans 30 µl de tampon de composition : Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM.

25

#### b) séquençage

Les réactions de séquençage sont réalisées à l'aide du kit de séquençage United States Biochemical (réf : 70770), qui utilise la méthode de Sanger et al ,  
30 Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 1977, 14, 5463-5467. Les amorces utilisées sont des oligonucléotides de 18 nucléotides, complémentaires soit au vecteur pSE1 dans la région immédiatement en 5' de l'ADNc NC28, soit à la séquence de l'ADNc NC28.

## 2) Analyse de la séquence de l'ADNc NC28 :

La description ci-après sera mieux comprise à l'aide des figures 2, 3 et 4.

- 5 La figure 2 représente la séquence nucléotidique de l'ADNc NC28 et en vis-à-vis la séquence d'acides aminés déduite, les trois Met susceptibles d'initier la traduction étant soulignés, le site de N-glycosylation étant souligné en pointillés et le site de clivage probable du peptide signal étant indiqué par une flèche verticale.
- 10 La figure 3 et la figure 4 représentent respectivement l'alignement d'après l'homologie maximale selon la méthode de Needleman et Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48, 443-453 de la séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc NC28 (ligne supérieure) et de la séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc de la cytokine MCP-1 (ligne inférieure) et l'alignement selon cette
- 15 méthode de l'ADNc NC28 (ligne supérieure) et de l'ADNc de la cytokine MCP-1 (ligne inférieure).

### Analyse de la séquence de l'ADNc NC28

- 20 (1) L'ADNc NC28 comporte 804 nucléotides et se termine par une séquence poly-A.
- (2) Ce nombre de nucléotides est en accord avec la taille de l'ARN messager correspondant (environ 0,8 kb), mesurée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % en présence de formaldéhyde (Sambrook, op cité), suivie d'un transfert sur
- 25 membrane de nylon (Hybond N+ Amersham) et hybridation selon le protocole décrit ci-après.

- Cette membrane est hybridée avec une sonde radiomarquée avec du  $^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham) fabriquée à partir de l'ADNc NC28 par coupure partielle de ce dernier à l'aide de la DNase I, suivie d'une polymérisation à
- 30 l'aide de l'enzyme ADN polymérase I (technique dite de "nick-translation"), comme décrit par Sambrook et al, op cité. L'hybridation se fait à 42°C pendant 16 h en milieu aqueux contenant 50 % de formamide, 1M de NaCl, une solution de 5 x Denhardt et 0,1 % de SDS. Les membranes sont lavées plusieurs fois à température ambiante avec une solution 2 x SSC contenant
- 35 0,1 % de SDS, puis lavées deux fois à 50°C pendant 15 min avec une solution

0,1 x SSC contenant 0,1 % de SDS. La solution de 5 x Denhardt a la composition suivante : Ficoll (type 400 - Pharmacia) 1 g/l, polyvinylpyrrolidone 1 g/l et BSA 1 g/l. La solution 1 x SSC contient 0,15M de NaCl et 0,015M de citrate de sodium.

- 5 (3) A la position 787-792 la séquence CATAAA, qui ressemble à la séquence consensus AATAAA décrite par M. Birnstiel et al, 1985, Cell, 41, 349, est probablement un signal de polyadénylation. A la position 534-554, une région riche en A et T : TTATTAATATTTTAATTTAAT contient le motif consensus d'instabilité ATTTA décrit par G. Shaw et al, 1986, Cell, 46, 659-667. La  
10 plupart des cytokines connues possèdent une telle région riche en A et T, qui contient ce motif consensus d'instabilité.
- (4) La séquence d'ADN comporte une phase de lecture ouverte pour la traduction d'une protéine à partir de l'ATG en position 41-43 jusqu'au TGA à la position 368-370 qui correspond à un codon d'arrêt de la traduction. Dans cette  
15 phase de lecture il y a trois codons ATG aux positions 41-43, 53-55 et 71-73, susceptibles d'initier la traduction. Parmi ceux-ci, l'environnement nucléotidique de l'ATG aux positions 71-73 est celui qui se rapproche le plus de la séquence consensus décrite par Kozak M., 1978, Cell, 15, 1109-1123, pour l'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes
- 20 (5) Un logiciel de recherche de peptide signal, appelé par la suite logiciel PS, a été développé par la Demanderesse d'après la méthode et les informations décrites par Von Heijne, 1986, Nucl. Ac. Res. 14, 483-490. Ce logiciel prévoit dans cette phase de lecture une région hydrophobe ressemblant à un peptide signal et un site probable de clivage protéique à la position 139-140 (entre Ala  
25 et Gln). Le peptide signal prévu est compris entre l'une des trois Met susceptibles d'initier la traduction et ce site de clivage. La protéine mature (protéine traduite clivée de son peptide signal) comprend donc 76 acides aminés (cf. figure 2)
- (6) La séquence d'acides aminés de la protéine déduite de l'ADNc NC28 et celle  
30 de l'ADNc NC28 ont été comparées respectivement à la séquence de la protéine déduite de l'ADNc de la cytokine MCP-1, et à la séquence de l'ADNc de la cytokine MCP-1, à l'aide d'un logiciel approprié, à savoir le logiciel UWGCG de l'Université du Wisconsin : Devereux et al., 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8721 - Option GAP : alignement optimal des séquences d'après la  
35 méthode de Needleman et Wunsch, 1970 J. Mol. Biol., 48, 443-453. Cette



comparaison a montré environ 74 % d'identité entre la séquence d'acides aminés de la protéine déduite de l'ADNc NC28 et celle de la cytokine MCP-1 (73 acides aminés identiques sur les 99 acides aminés) et environ 79 % d'identité entre la partie de l'ADNc NC28 codant pour la protéine déduite et  
5 l'ADNc de la cytokine MCP-1 (235 nucléotides identiques sur les 297 nucléotides).

Le site de clivage prédit par le logiciel PS, à la position 139-140 (entre Ala et Gln) correspond à celui constaté expérimentalement pour la cytokine MCP-1 par E. Robinson et al, 1989, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 86,  
10 1850-1854. L'ATG en position 71-73 de l'ADNc NC28 correspond à l'ATG initiateur de la traduction de la cytokine MCP-1

L'homologie entre la séquence d'acides aminés de la protéine traduite de l'ADNc NC28 et celle de la cytokine MCP-1 indique que la protéine traduite de l'ADNc NC28 est une protéine sécrétée, de type cytokine.

15

#### **SECTION 5 : Analyse de la sécrétion dans les cellules COS de la protéine codée par l'ADNc NC28**

20 Les cellules COS sont des cellules de reins de singe exprimant l'antigène T du virus SV40 (Gluzman, Y. Cell 23, 1981, 175-182). Ces cellules, qui permettent la réplication des vecteurs contenant l'origine de réplication de l'ADN du virus SV40 (cas du vecteur pSE1), constituent des hôtes de choix pour l'étude de l'expression de gènes dans les cellules animales.

25

1) Transfection des cellules COS et expression transitoire de la protéine codée par l'ADNc NC28 :

30  $5 \times 10^5$  cellules COS sontensemencées dans une boîte de Pétri de 6 cm de diamètre (Corning) dans 5 ml de milieu modifié d'Eagle selon Dulbecco ci-après appelé DMEM (le Dulbecco's Modified Eagle's medium de Gibco réf.041-01965), lequel contient 0,6 g/l glutamine, 3,7 g/l  $\text{NaHCO}_3$  et est complémenté avec du sérum de veau foetal (Gibco) à raison de 5 %. Après environ 16 h de culture à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de dioxyde  
35 de carbone, le milieu de culture est enlevé par aspiration et les cellules sont

- lavées avec 3 ml de tampon PBS (le Phosphate Buffered Saline de GIBCO). On y ajoute alors le mélange suivant : 1000  $\mu$ l de (DMEM + 10 % sérum de veau foetal (Gibco)), 110  $\mu$ l de diéthylamino-éthyl-dextrane de poids moléculaire moyen 500 000, à une concentration de 2 mg/ml (Pharmacia), 1,1  $\mu$ l de chloroquine 100mM (Sigma) et 6  $\mu$ g d'ADN plasmidique du clone NC28, préparé selon la technique de lyse alcaline suivie de la purification de l'ADN plasmidique sur un gradient de chlorure de césium (Sambrook et al, op cité). Après 5 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de dioxyde de carbone, le mélange est retiré des cellules. On y ajoute alors 2 ml de tampon PBS contenant 10 % de diméthyl sulfoxyde (qualité Spectroscopie, Merck). Après 1 min d'incubation à la température ambiante, le mélange est retiré et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et sont incubées dans du milieu DMEM contenant 2 % de sérum de veau foetal . L'incubation est poursuivie pendant 40 h à 37°C sous atmosphère contenant 5 % de dioxyde de carbone.
- 15 D'autre part, on a préparé des cellules COS témoins en effectuant les opérations décrites ci-dessus avec l'ADN du plasmide pSE1.

## 2) Marquage des protéines :

- 20 L'ensemble des opérations décrites ci-dessous est effectué avec les cellules COS transfectées par l'ADN plasmidique du clone NC28 et les cellules COS témoins.

- Le milieu de culture est enlevé par aspiration et les cellules sont lavées deux fois avec 3 ml de tampon PBS. On ajoute 5 ml de milieu MEM (Minimal Eagle's Medium) sans méthionine (Gibco - réf.041-01900H), complété avec 3 g/ml de glucose et 4 mM de glutamine. On incube pendant 2 h à 37°C. On enlève le milieu de culture et on rajoute 2 ml de même milieu additionné de 200  $\mu$ Ci de méthionine <sup>35</sup>S (réf. SJ1015 Amersham). On incube pendant 6 h à 37°C. On prélève le milieu de culture, on le centrifuge pendant 5 min pour éliminer les débris cellulaires et les cellules en suspension, et on garde le surnageant. Les cellules adhérentes sont rincées deux fois avec du tampon PBS, grattées avec un grattoir en caoutchouc et centrifugées.
- 30

3) Analyse des protéines radiomarquées des cellules COS transfectées, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide :

On précipite 1 ml du surnageant des cellules COS transfectées et 9 ml  
5 d'acétone à  $-20^{\circ}\text{C}$ . On centrifuge et on récupère les culots de protéines. On les reprend dans un tampon de composition : Tris 0,125M pH 6,8, SDS 4 %, glycérol 20 %. Une partie aliquote de la suspension obtenue correspondant à une radioactivité de 200 000 cpm est analysée par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 15 % en présence de SDS selon la technique décrite par U.K.  
10 Laemmli, Anal. Biochem., 1977, 78, 459. Le gel est séché sous vide. Les protéines radiomarquées sont révélées par autoradiographie.

On constate sur l'autoradiogramme la présence de quatre bandes surnuméraires pour les cellules transfectées par l'ADN plasmidique du clone NC28 par rapport aux cellules témoins : deux bandes de forte intensité  
15 correspondant à des masses moléculaires apparentes de  $9 \pm 2$  et  $16 \pm 2$  kDa et deux bandes de faible intensité correspondant à des masses moléculaires apparentes de  $11 \pm 2$  et  $17 \pm 2$  kDa (cette dernière bande est diffuse). La masse moléculaire pour la protéine mature de 76 acides aminés est de 8956 kDa, donc proche de la masse moléculaire apparente correspondant à la première de ces  
20 bandes.

Les différentes bandes observées ou certaines d'entre elles peuvent correspondre à des degrés de glycosylation divers de la protéine de l'invention. Celle-ci présente en effet (cf. fig. 2) un résidu asparagine susceptible d'être N-glycosylé (souligné en pointillés sur la figure 2 et correspondant à la  
25 séquence consensus décrite par DONNER et al. J. Cell. Biol. 1987, 105, 2665) et plusieurs résidus sérine et thréonine susceptibles d'être O-glycosylés.

4) Mise en évidence de la N-glycosylation probable des formes de masse moléculaire apparente  $16 \pm 2$  et  $17 \pm 2$  kDa

30

Le marquage des protéines est effectué comme en 2) ci-dessus mais en présence de 10  $\mu\text{g/ml}$  de tunicamycine (Sigma-réf. T7765), agent inhibiteur de la N-glycosylation des protéines.

L'analyse des protéines sur gel de polyacrylamide est effectuée comme  
35 en 3).

On constate sur l'autoradiogramme la présence de deux bandes surnuméraires pour les cellules transfectées par l'ADN plasmidique du clone NC28, par rapport aux cellules témoins : une bande de forte intensité correspondant à une masse moléculaire apparente de  $9 \pm 2$  kDa et une bande de faible intensité correspondant à une masse moléculaire apparente de  $11 \pm 2$  kDa. Ces résultats montrent que les deux formes de la protéine recombinante observées en 3) correspondant à une masse moléculaire de  $16 \pm 2$  et  $17 \pm 2$  kDa sont N-glycosylées.

10

#### **SECTION 6 : Purification de la protéine recombinante sécrétée par les cellules COS**

##### **1) Production de la protéine recombinante**

15

$4 \times 10^7$  cellules COS sontensemencées dans un flacon de culture cylindrique, dénommé habituellement "roller", de surface  $850 \text{ cm}^2$  dans 150 ml de milieu modifié d'Eagle selon Dubelcco ci-après appelé DMEM (le Dulbecco's Modified Eagle's medium de Gibco réf: 041-01965), lequel contient 0,6 g/l glutamine, 3,7 g/l  $\text{NaHCO}_3$  et est complétement avec du sérum de veau foetal (Gibco) à raison de 5 % puis tamponné avec du dioxyde de carbone. Après environ 16 h de culture à  $37^\circ\text{C}$  avec une vitesse de rotation d'environ 0,2 tr/min, le milieu de culture est enlevé par aspiration et les cellules sont lavées avec du tampon PBS (le Phosphate Buffered Saline de Gibco). On y ajoute alors le mélange suivant : 36 ml de (DMEM + 10 % sérum de veau foetal (Gibco), 4 ml de diéthyl-aminoéthyl-dextrane de poids moléculaire moyen 500 000, à une concentration de 2 mg/ml (Pharmacia),  $40 \mu\text{l}$  de chloroquine 100mM (Sigma) et  $128 \mu\text{g}$  d'ADN plasmidique du clone NC28, préparé selon la technique de lyse alcaline suivie de la purification de l'ADN plasmidique sur un gradient de chlorure de césium (Sambrook et al, op cité). Après 5 h d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  dans une atmosphère contenant 5 % de dioxyde de carbone, le mélange est retiré des cellules. On y ajoute alors 35 ml de tampon PBS contenant 7 % de diméthyl sulfoxyde (qualité Spectroscopie, Merck). Après 1 min et 30 s de rotation à la température ambiante, le mélange est retiré et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et sont incubées

35

pendant 5 jours à 37°C en rotation dans du milieu DMEM sans rouge de phénol. On prélève le surnageant, de volume environ 130 ml.

## 2) Isolement et purification de la protéine recombinante

5

La protéine recombinante a été isolée et purifiée à partir du surnageant obtenu ci-dessus, avec les étapes successives suivantes :

- Chromatographie d'échange d'ions sur une colonne DEAE-Sephacel (Pharmacia) préalablement équilibrée avec une solution de Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Dans ces conditions opératoires, la protéine ne se fixe pas sur le gel.
- 10 - Chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine séphacel (Pharmacia) préalablement équilibrée avec une solution de Tris-HCl 50 mM pH 8, avec comme éluant un gradient linéaire de NaCl de 0 à 1 M dans une solution de Tris-HCl 50 mM pH 8,0.
- 15 - Dialyse des fractions contenant la protéine recombinante, dont le degré de pureté, déterminé par analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, et révélation au nitrate d'argent est supérieur à 90 %, soit contre une solution de PBS pour l'échantillon soumis au test de chimiotactisme décrit dans la section 11, soit contre une solution de tampon MOPS 20 mM
- 20 pH 6,4 contenant 0,1 M NaCl, appelé solution 1, pour l'étape de chromatographie ci-après.
- Chromatographie d'échange cationique de ces fractions sur une colonne Mono S HR 5/5 (Pharmacia), préalablement équilibrée avec la solution 1, avec comme éluant un gradient linéaire de 0,1 à 0,4 M de NaCl dans la solution 1
- 25 (pendant 60 min) et une détection à 280 nm.

La protéine recombinante se trouve dans les fractions correspondant à deux pics, appelés fraction 1 et fraction 2, qui donnent respectivement, par analyse électrophorétique en présence de SDS, pour l'un, une bande majoritaire de masse moléculaire apparente de  $9 \pm 2$  kDa et une bande minoritaire de

30 masse moléculaire apparente de  $11 \pm 2$  kDa, pour l'autre, une bande majoritaire de masse moléculaire apparente de  $16 \pm 2$  kDa et une série de bandes faibles de masses moléculaires apparentes comprise entre  $(16 \text{ et } 18) \pm 2$  kDa.

L'analyse de chacune de ces deux fractions par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et révélation au nitrate d'argent, ne fait pas

35 apparaître d'autres bandes que les formes de la protéine NC28 décrites ci-

dessus, ce qui montre que dans chacune des fractions la protéine recombinante a un degré de pureté d'au moins 95 %.

### 3) Analyse de la séquence aminoterminal de chacune des fractions 1 et 2

5

Pour chacune des fractions 1 et 2, la séquence amino-terminale a été analysée à l'aide d'un séquenceur Applied Biosystem modèle 470A, couplé à un analyseur de dérivés phénylthiohydantoïques Applied Biosystem modèle 120A. La protéine purifiée (200 pmoles contrôlées par analyse d'acides aminés) a été déposée sur le séquenceur en présence de 20 pmol de  $\beta$ -lactoglobuline, protéine témoin.

10

Aucune séquence amino-terminale correspondant à la séquence d'acides aminés codée par l'ADNc NC28 n'a été détectée (par contre la séquence amino-terminale de la protéine témoin a été détectée, donc le séquenceur fonctionne).

15

Il y a donc probablement un blocage amino-terminal de chacune des différentes formes de la protéine recombinante.

### 4) Etude de la glycosylation des différentes formes de la protéine NC28

20

Les fractions 1 et 2 ont été soumises à des digestions à l'aide des 3 enzymes, N-glycanase, neuraminidase et O-glycanase (Genzyme), suivant le protocole décrit dans la fiche technique livrée avec ces enzymes.

Les produits de ces digestions enzymatiques ont été analysés par électrophorèse en présence de SDS suivant la technique de Laemmli UK, 1977, Anal Biochem., 78, 459.

25

Les résultats sont les suivants :

La bande majoritaire de masse moléculaire apparente de  $9 \pm 2$  kDa n'est pas modifiée en présence de N-glycanase, ni de neuraminidase, ni de O-glycanase.

30

La bande minoritaire de masse moléculaire apparente  $11 \pm 2$  kDa n'est pas modifiée par la N-glycanase, mais est modifiée par la neuraminidase en une bande de masse moléculaire apparente de  $10 \pm 2$  kDa, cette bande étant elle-même modifiée par la O-glycanase en une bande se confondant avec la bande majoritaire de masse moléculaire apparente de  $9 \pm 2$  kDa.

35

La bande majoritaire de masse moléculaire apparente  $16 \pm 2$  kDa n'est pas modifiée par la neuraminidase, ni par la O-glycanase, mais après action de la N-glycanase, elle se confond avec la bande majoritaire de masse moléculaire apparente de  $9 \pm 2$  kDa.

- 5 Les bandes de masses moléculaires apparentes comprises entre (16 et 18)  $\pm 2$  kDa, disparaissent sous l'action de chacune des trois enzymes.

Ces expériences montrent que la forme majoritaire de masse moléculaire apparente de  $9 \pm 2$  kDa est une forme de la protéine NC28 non glycosylée, la forme minoritaire de masse moléculaire apparente  $11 \pm 2$  kDa est une forme O-glycosylée de la protéine NC28 contenant 1 ou plusieurs acides sialiques, la  
10 forme majoritaire de masse moléculaire apparente  $16 \pm 2$  kDa est une forme N-glycosylée de la protéine NC28.

Les formes minoritaires de masses moléculaires apparentes comprises entre 16 et 18 kDa représentent probablement un mélange complexe de formes  
15 N- et O-glycosylées.

La protéine NC28 est le premier membre connu de la famille des cytokines SIS humaines, qui est N-glycosylé (A. Minty, 1991, Médecine Sciences, 7, 578). La cytokine MCP-1 existe dans une forme O-glycosylée mais pas dans une forme N-glycosylée (Jiang et al, 1990, J. Biol. Chem., 30,  
20 18318).

**SECTION 7 : Construction d'un vecteur d'expression de l'ADNc NC28 dans la**  
levure : le plasmide pEMR617 et transformation d'une souche  
25 de levure à l'aide de ce plasmide

1) Construction du plasmide pEMR617

Le plasmide pEMR583 (décrit dans la demande de brevet  
30 EP-435776) a été soumis à une digestion complète par les enzymes HindIII et BamHI. Le grand fragment (appelé ci-après fragment A) comprenant l'origine de replication et le locus STB du 2 micron, le gène LEU2d, le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de pBR322, le terminateur du gène PGK, le gène URA3, le promoteur artificiel et le début de la région prépro de la  
35 phéromone alpha a été purifié.

Le fragment HindIII - BamHI (nommé ci-après fragment B) comprenant la fin de la région prépro de la phéromone alpha et l'ADNc codant pour la protéine mature, flanqué du site de restriction BamHI en 3', a été obtenu par amplification par la technique PCR à partir du plasmide pSE1-NC28 . La séquence de ce fragment est précisée sur la figure 5. Les fragments A et B ont été ligués de façon à obtenir le plasmide pEMR617

a) Description de la technique de la réaction polymérase en chaîne  
(Polymerase chain reaction : PCR)

10

La technique de la réaction de polymérase en chaîne (PCR) est une méthode bien connue de l'homme de l'art qui permet de copier simultanément les deux brins d'une séquence d'ADN préalablement dénaturé en utilisant deux oligonucléotides comme amorces (cf. notamment l'ouvrage de H.A. Erlich : "PCR Technology : Principles and Applications for DNA amplification" publié en 1989 par les éditions Macmillan Publishers Ltd, Royaume-Uni et celui de M.A. Innis et al. "PCR Protocols" publié en 1990 par Academic Press Inc. San Diego, Californie 92101, USA). Le principe de cette technique est résumé ci-après.

20

La technique du PCR est basée sur la répétition de trois étapes, permettant d'obtenir, après entre 10 et 30 cycles, des centaines de milliers de copies de la matrice originale, à l'aide d'une ADN polymérase de *Thermus aquaticus*, habituellement appelée polymérase Taq. Les trois étapes sont les suivantes :

25

- Dénaturation de la matrice :

L'ADN double brin est dénaturé en ADN simple brin par incubation à haute température (de 92°C à 96°C) pendant approximativement 2 min.

30

- Hybridation des amorces :

Ces amorces sont une paire d'oligonucléotides synthétiques qui s'hybrident avec les extrémités de la région à amplifier. Les deux amorces



- 39 -

s'hybrident avec les brins opposés. Les amorces sont ajoutées en excès, de façon que la formation du complexe amorce-matrice soit favorisée.

- Extension des amorces :

5

L'étape au cours de laquelle la polymérase Taq assure l'extension du complexe amorce-matrice de 5' vers 3' est effectuée à 72°C.

Dans la technique du PCR, le produit d'intérêt apparaît au troisième cycle et il est alors amplifié de manière significative. Au cours du déroulement des cycles, le produit d'amplification devient rapidement la matrice avec laquelle les amorces s'hybrident.

b) Description des amorces utilisées

15

Deux oligonucléotides synthétiques ont été préparés.

Le premier oligonucléotide, appelé amorce 1, dont la séquence est la suivante :

20	ATCGA AGC TTG GAT AAA AGA	CAG CCA GTT GGG ATT AAT AC
	Ser Leu Asp Lys Arg	Gln Pro Val Gly Ile Asn
	Région 1	Région 2

possède deux régions distinctes : la région 1, qui contient la fin de la région prépro de la phéromone a modifiée par rapport à la séquence naturelle décrite par Kurjan et al, Cell, 1982, 30, 933-943 par une mutation silencieuse qui permet d'introduire un site HindIII juste avant la partie codante de la région 1 (cinquième nucléotide de la région 1), et la région 2, qui est une région destinée à s'hybrider avec la région codante correspondant au début de la protéine mature de 76 acides aminés (cf. section 4), du brin non codant de la partie du plasmide pSE1-NC28 qui porte l'ADNc NC28.

30

Le deuxième oligonucléotide, appelé amorce 2, dont la séquence est la suivante :

35	CAGTGGATCC	TCAAAGTTTTGGAGTTTGGG
	Région 1	Région 2

est également constitué de deux régions distinctes : la région 1 qui porte sur le cinquième nucléotide un site BamHI, et la région 2, qui porte une séquence nucléotidique correspondant aux derniers codons de la partie codante de l'ADNc-NC28 et au codon stop, avec une mutation destinée à supprimer le site HindIII (mutation silencieuse du codon AAG en AAA). Cette région est destinée à s'hybrider avec le brin codant de la partie du plasmide pSE1-NC28 qui porte l'ADNc NC28.

- 10 c) Obtention du fragment amplifié HindIII – BamHI représentant la fin de la région prépro de la phéromone  $\alpha$  et l'ADNc codant pour la protéine mature NC28.

On utilise comme matrice le plasmide pSE1 – NC28 qui porte l'ADNc codant pour la protéine NC28.

Dans un tube on ajoute 100 ng du plasmide pSE1 – NC28, 100 ng de l'amorce 1, 100 ng de l'amorce 2, 5  $\mu$ l de mélange réactionnel concentré 10 fois (quantité finale : 67mM Tris-HCl pH 8,8, 16,6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 mM  $\beta$  mercaptoéthanol, 6,7 mM EDTA, 0,15 % Triton x 100, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de dNTP, 200 ng de gélatine) le volume du mélange est ensuite porté à 50  $\mu$ l en ajoutant de l'eau.

On ajoute 0,5  $\mu$ l, soit 2,5 unités de Polymérase Taq (Boehringer Mannheim réf 1146 – 173). On couvre alors le mélange avec de la paraffine afin d'éviter l'évaporation de la solution aqueuse.

L'amplification se fait au cours de 15 cycles réactionnels, dont les étapes d'un cycle sont les suivantes :

- 1 min à 94°C -> dénaturation
- 1 min à 55°C -> hybridation
- 1 min à 72°C -> polymérisation

Après les 15 cycles, la réaction enzymatique est arrêtée par l'addition de 20 mM EDTA.

Le fragment d'ADN ainsi amplifié, qui présente la taille attendue d'environ 250 pb, est ensuite isolé et purifié sur gel d'agarose 1 %, soumis

pour dialyse à une chromatographie sur colonne de gel de polyacrylamide P10 (Pharmacia), puis hydrolysé totalement et simultanément par les enzymes HindIII et BamHI selon les techniques habituelles bien connues de l'homme de l'art (Sambrook et al, op cité) afin de former les extrémités cohésives HindIII et BamHI. Après hydrolyse le fragment est purifié sur colonne P10 .

La séquence du fragment B obtenu est représentée sur la figure 5. Elle comprend dans sa partie codant pour la protéine NC28 une mutation silencieuse par rapport à l'ADNc NC28, indiquée par un astérisque sur la figure 5.

Les fragments A et B ont été ligués de manière à obtenir le plasmide pEMR617.

2) Transformation de la souche de levure EMY761 par le plasmide pEMR617 et expression de la protéine NC28 par la souche transformée

La souche EMY761 (Mat alpha, leu2, ura3, his3) décrite dans le brevet EP-0408461 et pouvant être obtenue par curage plasmidique de la souche déposée à la CNCM le 27 Décembre 1989 sous le n° I-1021, contient des mutations (leu2 et ura3), susceptibles d'être complémentées par le marqueur de sélection défectif LEU2d et le marqueur de sélection URA3, présents dans le plasmide pEMR617. Elle a été transformée par le plasmide pEMR617 avec sélection pour la prototrophie de leucine selon une variante de la technique de transformation décrite par Beggs et al. (Beggs et al, 1978, Nature 275, 104-109) qui consiste à soumettre les levures à un traitement de protoplastisation en présence d'un stabilisant osmotique, le sorbitol en concentration 1 M.

Le protocole précis de transformation est indiqué ci-après :

a) 200 ml du milieu YPG liquide (cf. tableau 1 ci-après) sont inoculés avec environ  $5 \times 10^6$  cellules d'une culture en phase stationnaire et la culture ainsi inoculée est placée pendant une nuit sous agitation à 30°C.

b) Lorsque la culture atteint environ  $10^7$  cellules par ml, les cellules sont centrifugées à 4 000 tr/min pendant 5 min et le culot est lavé avec une solution de sorbitol 1 M.

- 42 -

c) Les cellules sont mises en suspension dans 5 ml de solution de sorbitol 1 M contenant 25 mM EDTA et 50 mM de dithiothréitol et incubées pendant 10 min à 30°C.

5 d) Les cellules sont lavées une fois avec 10 ml de solution de sorbitol 1 M et mises en suspension dans 20 ml de solution de sorbitol. De la zymolase-100T (préparation, commercialisée par Seykagaku Kogyo Co. Ltd., obtenue par purification partielle sur une colonne d'affinité du surnageant de culture d'Arthobacter luteus et contenant de la  $\beta$ -1,3-glucanase-laminaripentahydrolase) est ajoutée à une concentration finale de 20  $\mu$ g/ml et  
10 on incube la suspension à température ambiante pendant environ 15 min.

e) Les cellules sont remises en suspension dans 20 ml d'un milieu contenant du sorbitol appelé milieu YPG sorbitol (cf. tableau I ci-après) et incubées pendant 20 min à 30°C sous agitation douce.

f) On centrifuge pendant 3 min à 2 500 tr/min.

15 g) On remet en suspension les cellules dans 9 ml de tampon de transformation de composition : sorbitol 1 M, Tris-HCl pH 7,5 10 mM et  $\text{CaCl}_2$  10 mM).

h) On ajoute 0,1 ml de cellules et 5  $\mu$ l de solution d'ADN (environ 5 mg) et on laisse la suspension obtenue pendant 10 à 15 min à température  
20 ambiante.

i) On ajoute 1 ml de la solution : polyéthylène glycol PEG 4000 20 %, Tris-HCl 10 mM pH 7,5 et  $\text{CaCl}_2$  10 mM.

j) On verse 0,1 ml de la suspension obtenue en i) dans un tube contenant du milieu solide de régénération sans leucine (cf. tableau I ci-après)  
25 préalablement fondu et maintenu liquide à environ 45°C. On verse la suspension sur une boîte de Pétri contenant une couche solidifiée de 15 ml de milieu de régénération solide sans leucine.

Les transformés commencent à apparaître au bout de trois jours. On a ainsi obtenu un transformé, appelé souche EMY761 pEMR617.

**Tableau 1**

Composition et préparation des principaux milieux utilisés dans le protocole de transformation de la souche de levure EMY761

- 5
- milieu YPG liquide  
10 g d'extrait de levure (Bacto-Yeast extract de Difco)  
20 g de peptone (Bacto-peptone de Difco)  
20 g de glucose
- 10
- mélanger les ingrédients dans de l'eau distillée. Compléter le volume final à 1 l avec de l'eau distillée - Autoclaver pendant 15 min à 120°C.
- milieu YPG sorbitol
- 15
- utiliser la formule du milieu YPG liquide auquel on ajoute, après autoclavage, du sorbitol à une concentration de 1 M.
- milieu solide de régénération sans leucine  
6,7 g de base azotée de levure sans acides aminés  
(Yeast nitrogen base without Amino Acids de Difco)
- 20
- 20 mg d'adénine  
20 mg d'uracile  
20 mg de L-tryptophane  
20 mg de L-histidine
- 25
- 20 mg de L-arginine  
20 mg de L-méthionine  
30 mg de L-tyrosine  
30 mg de L-isoleucine  
30 mg de L-lysine
- 30
- 50 mg de L-phénylalanine  
100 mg de L-acide glutamique  
150 mg de L-valine  
20 g de glucose  
30 g d'agar
- 35
- 182 g de sorbitol

- 44 -

mélanger tous les ingrédients dans l'eau distillée. Compléter le volume final à 1 l, avec de l'eau distillée. Autoclaver pendant 15 min à 120°C. Après autoclavage, ajouter 200 mg de L-thréonine et 100 mg d'acide L-aspartique.

5

**SECTION 8 : Expression en erlenmeyer de la protéine NC28 par la souche de levure transformée et mise en évidence de la protéine dans le milieu de culture sur gel de polyacrylamide en présence de SDS**

10 1) Culture de la souche EMY761 pEMR617

Une colonie de la souche EMY761 pEMR617 (obtenue dans la section 7) a été mise en culture dans 50 ml de milieu liquide sans uracile. Ce milieu contient pour 1 litre :

15

- 6,7 g de base azotée de levure sans acides aminés  
(Yeast nitrogen base without aminoacids de Difco).

20

- 5,0 g d'hydrolysate de caséine (casaminoacids de Difco)

- 10 g de glucose

Après une nuit à 30°C sous agitation, la culture a été centrifugée pendant 10 min, le culot a été repris dans 10 ml d'eau stérile et de nouveau centrifugée pendant 10 min. L'expression de la protéine NC28 a été induite en reprenant les cellules dans 50 ml de milieu de composition suivante :

25

- 6,7 g/l de base azotée de levure sans acides aminés (Difco)

30

- 5,0 g/l d'hydrolysate de caséine (casaminoacids de Difco)

- 30,0 g/l de glycérol

- 30,0 g/l de galactose

35

- 45 -

- 10 ml/l d'éthanol.

La culture a été replacée à 30°C sous agitation pendant 24 h.

5 2) Analyse de la protéine exprimée

a) gel de polyacrylamide en présence de SDS

Préparation des échantillons

10

Une partie des cellules cultivées pendant 1 nuit dans un milieu appelé milieu liquide sans uracile avec glucose dont la composition est précisée dans le tableau 2 ci-après, a été centrifugée : échantillon non induit. Les cellules cultivées pendant 1 nuit dans un milieu, appelé milieu liquide sans uracile avec éthanol, glycérol et galactose (tableau 2 ci-après) ont été centrifugées : 15 échantillon induit. Le surnageant a été recueilli. A 10 ml de surnageant, 5 ml d'acide trichloroacétique à 50 % contenant 2 mg/ml de désoxycholate ont été rajoutés.

Le mélange a été mis à la température de + 4°C pendant 30 min, puis 20 centrifugé pendant 30 min. Le culot a été repris dans environ 1 ml d'acétone froid (+ 4°C) et de nouveau centrifugé pendant 30 min. Le culot, après avoir été séché, est repris dans environ 20 µl d'un tampon dénommé tampon de charge constitué de Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 SDS 4 %, bleu de bromophénol 0,002 %, glycérol 20 %, β-mercaptoéthanol 10 % selon le 25 protocole décrit par Laemmli (cité précédemment). Le culot est solubilisé par ébullition pendant 15 min puis neutralisé jusqu'à ce que le bleu de bromophénol vire au bleu.

Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS et soumis à une électrophorèse

30

Résultats :

L'analyse du gel (révélation au bleu de Coomassie) montre pour l'échantillon induit la présence de plusieurs bandes supplémentaires par rapport à 35 l'échantillon non induit, dont les deux principales correspondent à un masse

moléculaire apparent de  $9 \pm 2$  (forme majoritaire) et  $11 \pm 2$  kDa. Les autres bandes supplémentaires observées d'une masse moléculaire apparente supérieure à  $16 \pm 2$  kDa, qui sont assez nombreuses et diffuses, correspondent probablement à un degré variable de glycosylation. On observe également une  
5 bande de faible intensité correspondant à une masse moléculaire apparente de 8 kDa.

On sait que la N-glycosylation d'une protéine par la levure fait intervenir une N-glycosylation simple ("core glycosylation") dans le reticulum endoplasmique et une N-hyperglycosylation ("outer-chain  
10 glycosylation") dans l'appareil de Golgi (R.A. Hitzeman et al, 1990, "Methods in Enzymology, n° 185", Academic Press, p. 421-440). En général la N-glycosylation simple conduit à une glyco-protéine de poids moléculaire apparent homogène (une bande) et la N-hyperglycosylation à une glycoprotéine de poids moléculaire apparent hétérogène (pluralité de bandes  
15 diffuses). On sait également que certaines protéines peuvent être O-glycosylées par la levure (J. Zucco et al, 1986, Biochemica et Biophysica Acta, 884, 93-100).

La N-glycosylation peut être mise en évidence de plusieurs manières (P. Oleans et al, 1991, Methods in Enzymology, 194, 682-697). L'une d'elles  
20 consiste à observer la diminution de la masse moléculaire apparente de la protéine lorsqu'elle est traitée à l'endoglycosydase H (Endo-b-N-acétylglucosaminidase : E.C. 32.1.96) qui coupe spécifiquement les chaînes N-liées carbohydatées. La O-glycosylation peut être présumée lorsque la protéine est résistante à l'endoglycosydase H et que sa masse moléculaire  
25 apparente diminue après traitement à l' $\alpha$ -mannosidase ( $\alpha$ -D-manoside mannohydrolase : E.C. 3.2.1.24), comme décrit par Biemans et al, 1991, DNA and Cell Biology, 10, 191-200.

b) Immunoempreinte (Western blot) avec traitement éventuel à  
30 l'endoglycosidase H

#### Préparation des échantillons

Une partie des cellules cultivées pendant une nuit en milieu liquide  
35 sans uracile avec glucose (tableau 2) a été centrifugée : échantillon non induit.



Les cellules cultivées pendant une nuit en milieu liquide sans uracile avec éthanol, avec glycérol et galactose, (tableau 2) ont été centrifugées : échantillon induit. Le surnageant a été recueilli. A 10 ml de surnageant, 5 ml d'acide trichloroacétique à 50 % contenant 2 mg/ml de désoxycholate ont été  
5 rajoutés.

Le mélange a été mis à la température de + 4°C pendant 30 min, puis centrifugé pendant 30 min. Le culot a été repris dans environ 1 ml d'acétone froid (+ 4°C) et de nouveau centrifugé pendant 30 min. Le culot est repris dans 40 µl d'un tampon de solubilisation (de composition : Tris-HCl pH 6.8  
10 10 mM, β mercaptoéthanol 2 %, SDS 1 %). Le culot est porté à 100°C pendant 15 min.

L'échantillon est ensuite partagé en quatre parties

- 15 - à la première partie de 10 µl, on ajoute 10 µl d'un tampon citrate de sodium 50 mM pH 5 et 5 µl d'endoglycosidase H (5mUI-Boehringer réf. 1088726). L'échantillon est placé à 37°C pendant environ 1 nuit. On ajoute ensuite 20 µl de tampon de charge ;
- 20 - à la deuxième partie de 10 µl, on ajoute 10 µl de tampon citrate de sodium 50 mM pH 5 et 2,5 µl d'α-mannosidase (Sigma Réf. M7257). L'échantillon est placé à 37°C pendant environ 1 nuit. On ajoute ensuite 20 µl de tampon de charge ;
- 25 - à la troisième partie de 10 µl, on ajoute 10 µl de tampon citrate de sodium 50 mM pH 5 et 5 µl d'endoglycosidase H (Boehringer). L'échantillon est placé à 37°C pendant environ 1 nuit. On ajoute ensuite 2,5 µl d'α-mannosidase (Sigma). L'échantillon est placé à 37°C pendant 1 nuit. On ajoute 20 µl de tampon de charge ;
- 30 - à la quatrième partie de 10 µl, on ajoute 10 µl de tampon de charge. Les échantillons sont portés à ébullition pendant 10 min. On dépose les échantillons sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et on effectue une électrophorèse selon le protocole de Laemmli, Anal. Biochem., 1977, 78, 459.

Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (selon la technique de H. Towbin et al, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354). L'immunodétection, réalisée selon le protocole décrit dans l'immuno-Blot Assay Kit de Bio-Rad (réf. 170-  
35 6450) implique les étapes suivantes :

- 48 -

- la saturation de la membrane de nitrocellulose avec un tampon TBS ("Tris Buffered Saline") qui contient 3 g/100 ml de gélatine pendant 30 min ;
- le rinçage de la membrane avec un tampon dénommé T. TBS (Tampon TBS qui contient 0,05 % de Tween 20), deux fois pendant 5 min ;
- 5 - la mise en contact de la membrane avec l'immunsérum préparé dans la section 10, pendant 1 h à température ambiante ;
- le rinçage de la membrane avec le tampon T.TBS, deux fois pendant 5 min et une fois pendant 5 min avec le tampon TBS ;
- le complexe antigène-anticorps est révélé par la mise en contact de la mem-
- 10 brane avec un tampon de développement contenant du chloro-4 naphtol-1 dans du diéthylène et du peroxyde d'hydrogène ;
- le rinçage de la membrane avec de l'eau.

#### Résultats :

15

L'analyse de l'immunoempreinte montre pour l'échantillon induit non traité à l'endoglycosidase H la présence de plusieurs bandes supplémentaires par rapport à l'échantillon non induit, dont les deux principales correspondent à une masse moléculaire apparente de  $9 \pm 2$  et  $11 \pm 2$  kDa. Ces deux bandes sont

20 reconnues par l'immunsérum. Des bandes diffuses de poids moléculaire apparent supérieur à  $16 \pm 2$  kDa sont également mises en évidence.

Dans l'échantillon induit les bandes diffuses correspondant au poids moléculaire supérieur à  $16 \pm 2$  kDa tendent à disparaître après traitement à l'endoglycosidase H pour laisser place à une bande de masse moléculaire

25 apparente de  $16 \pm 2$  kDa pouvant correspondre au précurseur ayant gardé la séquence pro de la phéromone. Dans ce même échantillon traité, on note que les deux bandes principales de poids moléculaires apparents de  $9 \pm 2$  et  $11 \pm 2$  kDa sont toujours présentes.

Dans l'échantillon induit la bande correspondant à un poids

30 moléculaire apparent de  $11 \pm 2$  kDa tend à disparaître après traitement à l' $\alpha$ -mannosidase tandis que la bande de  $9 \pm 2$  kDa augmente en intensité dans les mêmes conditions. Ceci semble indiquer que la protéine correspondant à une masse moléculaire apparente de  $11 \pm 2$  kDa est O-glycosylée.

**Tableau 2**

Composition et préparation de certains milieux  
utilisés pour la préparation des échantillons :

5

- Milieu liquide sans uracile avec glucose :
- 6,7 g de base azotée de levure sans acides aminés  
(Yeast nitrogen base without amino acids de Difco)
- 5,0 g d'hydrolysate de caséine (casaminoacids de Difco)

10 - 10,0 g de glucose

mélanger tous les ingrédients dans de l'eau distillée, et compléter à 1 l final  
avec de l'eau distillée.

Autoclaver pendant 10 min à 120°C.

15

- Milieu liquide sans uracile avec éthanol, glycérol et galactose :
- utiliser la formule du milieu liquide sans uracile décrite ci-dessus mais sans  
glucose. Après autoclavage ajouter 10 ml d'éthanol 100 %, 30 g de glycérol et  
30 g de galactose

20

**SECTION 9 : Purification de la protéine NC28 produite dans la levure et  
détermination de sa séquence aminoterminal**

25 1) Purification de la forme majoritaire de la protéine NC28 produite par levure

La forme majoritaire de la protéine recombinante de masse moléculaire  
apparente de  $9 \pm 2$  kDa (cf. section 8-2)-a)) a été isolée et purifiée à partir du  
milieu de culture obtenu à l'issue de la section 8-1), à l'aide d'un protocole  
comportant les étapes successives suivantes :

30

- Chromatographie d'échange d'ions sur une colonne DEAE-Sephacel  
(Pharmacia préalablement équilibrée avec une solution de Tris-HCl 50 mM  
pH 8,0. Dans ces conditions opératoires, la protéine ne se fixe pas sur le gel.

35 - Chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine séphacel (Pharmacia)  
préalablement équilibrée avec une solution de Tris-HCl 50 mM pH 8, avec

- 50 -

comme éluant un gradient linéaire de NaCl de 0 à 1 M dans une solution de Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

- 5 - Dialyse des fractions contenant la protéine recombinante (déterminées par analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en présence de SDS) contre une solution de tampon PBS.

## 2) Analyse de la protéine purifiée

### a) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

10

L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et révélation au nitrate d'argent montre la présence d'une bande intense correspondant à une masse moléculaire apparente de  $9 \pm 2$  kDa et de deux bandes de très faible intensité correspondant à des masses moléculaires

15 apparentes de  $8 \pm 2$  et  $11 \pm 2$  kDa. La pureté de la protéine recombinante correspondant à ces trois bandes est supérieure à 90 %.

### b) Détermination de la séquence aminoterminal :

20

La séquence amino-terminale est déterminée selon le principe de la dégradation d'Edman (Kia-Ki Han et al, 1977, Biochimie, 59, 557). Le premier acide aminé amino-terminal est couplé au phényl-isothiocyanate (PITC), puis clivé. Le dérivé obtenu est converti en un phénylthioindantoïne-acide aminé stable, absorbant à 269 nm. Le produit de chaque cycle est analysé par HPLC.

25

On détecte trois séquences aminoterminales ci-après dans les proportions respectives 70 %, 20 % et 10 % :

. séquence 1 : Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr

. séquence 2 : Val Gly Ile Asn Thr

30

. séquence 3 : Lys Ile Pro Lys Gln

La séquence 1 est la séquence aminoterminal attendue : celle de la protéine mature de 76 acides aminés (cf. figure 2) décrite dans la section 4, dont la séquence codante est introduite dans le vecteur pEMR617 décrit dans la

35 section 7.

Les séquences 1 et 2 sont les séquences amino-terminales de la protéine mature de 76 acides aminés respectivement clivée dans sa partie aminoterminal de 2 et 18 acides aminés.

5

#### **SECTION 10 : Synthèse de peptides et production d'immunsérums**

##### **1) Synthèse de peptides**

- 10 Plusieurs peptides ont été synthétisés, soit manuellement par la méthode dite du "sachet de thé" ("tea bags"), décrite par Houghten, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci-USA, 82, 5131, soit par une méthode utilisant un synthétiseur Milligen. Dans la première méthode, le support de synthèse est enfermé dans une enveloppe perméable et résistante aux solvants ; ainsi, les étapes
- 15 communes de synthèse (activations, lavages, etc..) peuvent être réalisées simultanément pour un grand nombre de peptides. La deuxième méthode permet de faire une synthèse complètement automatisée. Dans les deux cas, la chimie de synthèse est celle utilisée couramment pour la synthèse de peptides en phase solide (Merrifield et al, 1963, J. Am. Chem Soc. 85, 2149-2154).
- 20 Dans cette méthode, le résidu carboxy-terminal du peptide à synthétiser est attaché à un polymère insoluble, ensuite différents acides aminés sont ajoutés. La chaîne polypeptidique augmente de taille dans le sens amino-terminal. Après la synthèse, le peptide est séparé du support par l'acide fluorhydrique et récupéré en solution.
- 25 Par la première méthode, on a synthétisé les peptides correspondant aux acides aminés 90-109, 94-109 et 97-109 de la protéine traduite NC28 (cf. figure 2), appelés respectivement peptides C20, peptide C16 et peptide C13. Le peptide correspondant aux acides aminés 48-69 de la protéine traduite de l'ADNc NC28, appelé peptide 48-69, a été synthétisé automatiquement. La
- 30 totalité des peptides a été purifiée par HPLC, la détermination de la composition en acides aminés et le séquençage du peptide ont été effectués sur les produits purifiés.

- L'analyse de la composition en acides aminés est entièrement automatisée. L'analyseur d'acides aminés (modèle 420A, Applied Biosystems)
- 35 effectue l'hydrolyse, puis la dérivation des acides aminés libérés. La séparation

des acides aminés dérivés est réalisée par un système HPLC Brownlee 130A connecté en ligne avec le système 420A.

- 5 La séquence amino-terminale est déterminée selon le principe de la dégradation d'Edman. Le premier acide aminé amino-terminal est couplé au phényl-isocyanate (PITC), puis clivé. Le dérivé obtenu est converti en un phénylthioidantoïne-acide aminé stable, absorbant à 254 nM. Le produit de chaque cycle est analysé par HPLC.

## 2) Préparation d'immunsérums

10

Afin de produire des immunsérums, le peptide 48-69 est couplé à une protéine porteuse l'hémocyanine de *Fisurella* (KLH) par son résidu cystéine carboxy-terminal avec le m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) comme agent couplant.

15

Des lapins (New Zealand, mâles de 2 Kg environ) sont immunisés avec le conjugué peptide 48-69/KLH (quantité correspondant à 800 µg de peptide) (lapin N° 43) ou avec 50 µg de protéine NC28 (purifiée à partir de levure - section 9) (lapin N° 44) toutes les deux semaines selon le protocole décrit par Vaitukaitis, 1981, Methods in Enzymology, 73, 46. Pour la première injection, un volume de solution antigénique est émulsifié par un volume d'adjuvant complet de Freund (Sigma-réf. 4258). Les rappels (3 pour le lapin N° 43 et 6 pour le lapin N° 44) sont administrés dans l'adjuvant incomplet de Freund (Sigma-réf. 5506).

20

- 25 Les immunsérums obtenus sont capables de reconnaître la protéine NC28 produite dans la levure et dans les cellules COS par immunodétection après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

**SECTION 11 : Mise en évidence pour la protéine NC28 et les peptides carboxyterminaux de cette dernière, d'une activité chimiotactique**

**5 1) Méthode utilisée**

**a) Isolement des neutrophiles**

A partir du sang périphérique on enlève la plupart des hématies par  
10 sédimentation à 37°C pendant 30 min dans une solution contenant 0,6 %  
dextran T500 (Pharmacia -réf : 17-0320-01) et 0,09 % NaCl. Par la suite les  
cellules sont déposées par dessus une couche de Ficoll-Paque (Pharmacia) et  
centrifugées à 400 g pendant 30 min. Les cellules mononucléaires du sang  
périphérique (PBMNC) sont présentes à l'interface entre le Ficoll et le  
15 surnageant alors que les hématies résiduelles et les polynucléaires  
(principalement des neutrophiles) se trouvent dans le culot cellulaire. Ce culot  
est remis en suspension dans une solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,8 %, 10mM Hepes et  
incubé à 37 °C pendant 7 min pour faire éclater les hématies. Les cellules  
résiduelles (principalement des neutrophiles) sont centrifugées et lavées dans  
20 du tampon HBSS de Hanks Solution Saline équilibrée(Gibco BRL-Réf. 041-  
04020 H), appelée ci-après solution HBSS.

**b) Isolement des monocytes**

25 Le principe d'isolement des monocytes a été décrit par A. Boyum,  
1983, Scan. J. Immunol., 17, 429-436. Il est résumé ci-après. La méthode  
consiste à séparer les monocytes du sang en utilisant un milieu de gradient iodé,  
le Nycodenz (N,N'-Bis (dihydroxypropyl-2,3), [N-(dihydroxy propyl-2,3)  
acétamido]-5-triido-isophthalamide-2,4,6). Pour accentuer la différence de  
30 densité entre les monocytes et des lymphocytes, l'osmolarité de la solution est  
augmentée, donc les lymphocytes rejettent de l'eau et deviennent plus denses.  
On peut utiliser du milieu "NycoPrep 1.068", qui contient du Nycodenz, du  
chlorure de sodium et de la tricine/NaOH à des concentrations optimales pour  
la séparation des monocytes (Nycomed Pharma AS, Norvège-réf. 223510).

Le protocole utilisé est le suivant :

A partir du sang périphérique on enlève la plupart des hématies par sédimentation à 37°C pendant 30 min dans une solution contenant 0,6 % de dextran et 0,09 % NaCl. La phase supérieure du plasma contenant les monocytes, les lymphocytes et les neutrophiles est prélevée. Pour séparer les monocytes des autres cellules, des tubes sont préparés de la façon suivante : 6 ml de plasma sont déposés sur une couche de 3 ml de NycoPrep 1.068 (Nycomed Pharma AS, Norvège, réf. 223510) dans un tube de diamètre 13-14 mm. Après centrifugation à 600 g pendant 15 min, on prélève le plasma clarifié jusqu'à 3-4 mm au dessus de l'interphase et on recueille le reste du plasma et toute la solution de NycoPrep jusqu'à environ 1 cm au dessus du culot cellulaire, ce qui permet de ne pas prélever les lymphocytes. La suspension de monocytes recueillie est complétée jusqu'à un volume de 6-7 ml avec une solution de composition : 0,9 % NaCl 0,13 % EDTA 1 % BSA, puis centrifugée pendant 7 min à 600 g.

Les monocytes sont contaminés avec des plaquettes. Pour éliminer ces dernières, on centrifuge puis on enlève le surnageant et on remet en suspension avec la même solution, en répétant ces opérations 3 fois.

Les cellules sont remises en suspension dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) contenant de l'albumine sérique bovine (BSA) 0,5 %

#### c) Protocole de mise en évidence du chimiotactisme

Le test utilisé est celui décrit par W. Falk et al, 1980, J. Imm. Meth., 33, 239-247. Le protocole précis utilisé est exposé ci-après :

On utilise la chambre de Boyden modifiée pour mesure de chimiotactisme, commercialisée par Neuroprobe (réf. AP48). On met les échantillons à tester dilués dans une solution HBSS pour les tests sur les neutrophiles, et le milieu RPMI contenant 0,5 % BSA pour le test sur les monocytes, dans les puits de la plaque inférieure. On dépose sur celle-ci un filtre de polycarbonate (taille des pores : 5 mm-Nuclepore réf. 155845) avec le côté brillant en bas. On dépose la plaque supérieure sur le filtre. On met les cellules (50 000 pour 50 µl tampon) dans les puits de la plaque supérieure. On incube la chambre à 37°C dans une étuve humidifiée ou dans une boîte



- 55 -

contenant du coton mouillé pendant 1 h pour le test sur les neutrophiles, et 3 h pour le test sur les monocytes. On retire le filtre et on enlève les cellules qui sont sur le côté mat (cellules qui n'ont pas migré) en essuyant le filtre et en le raclant avec un grattoir en caoutchouc, ces deux dernières opérations étant répétées 1 fois. Les cellules qui ont migré sont colorées et fixées en utilisant le kit "Diff-quick" (Dade-réf. 130832). Par observation microscopique, on compte le nombre de cellules sur le côté brillant du filtre (cellules qui ont migré)

d) Préparation des échantillons

10

a) Echantillons de protéines recombinantes :

- protéine NC28 issue de cellules COS, purifiée comme décrit dans la section 6.

15

- protéine NC28 issue de levure, purifiée comme décrit dans la section 9

- cytokine MCP-1, obtenue de la façon suivante : isolement d'un plasmide pSE1 porteur de l'ADNc de la cytokine MCP-1 par criblage de la banque préparée dans la section 2 à l'aide d'un oligonucléotide correspondant à une partie de l'ADNc de la cytokine MCP-1 décrite par Yoshimura T. et al, 1989, Febs Lett., 244, 487-493, puis transfection des cellules COS, culture des cellules COS transfectées et purification de la cytokine MCP-1, comme décrit pour la protéine NC28.

25

- protéine IL-8 (Endogen -réf : CY-09025)

b) Echantillons de peptides :

30

- peptide C13 ) préparés comme décrit dans
- peptide C16 ) la section 10
- peptide C20 )
- peptide formyl-Met-Leu-Phe, généralement appelé fMLP (Sigma- réf. F 3506)

35

## 2) Résultats

### a) chimiotactisme de la protéine NC28 purifiée issue des cellules COS et de la protéine NC28 purifiée issue de levure, sur les monocytes

5 Certains résultats obtenus sont illustrés sur la figure 6a qui représente le nombre de cellules par champ microscopique en fonction de la concentration exprimée en nM pour la protéine NC28 purifiée issue de levure, la protéine NC28 purifiée issue de cellules COS, les peptides C13, C16, C20 et fMLP et  
10 sur la figure 6b qui représente le nombre de cellules par champ microscopique en fonction de la concentration exprimée en ng/ml pour la protéine NC28 purifiée issue de levure et la cytokine MCP-1 purifiée issue des cellules COS.

On constate sur la figure 6a que la protéine NC28 purifiée issue de levure et la protéine NC28 purifiée issue de cellules COS, présentent après 3 h  
15 d'incubation une activité de chimiotactisme sur les monocytes nettement supérieure à celle du fMLP, peptide connu comme possédant une activité de chimiotactisme sur les monocytes (Schiffmann E. et al, J. Immunol. 114, 1831). Les peptides carboxyterminaux de la protéine NC28 possèdent également cette activité.

20 On constate sur la figure 6b que l'activité de chimiotactisme sur les monocytes de la protéine NC28 est du même ordre de grandeur que celle de la protéine MCP-1, connue pour cette activité (Rollins B. J. et al, 1991, Blood, 78, 1112) et que cette activité est constatée à des concentrations de 0,1 à 10 ng/ml

25

### b) Chimiotactisme de la protéine NC28 purifiée issue de levure sur les neutrophiles

Certains résultats obtenus sont illustrés sur la figure 6c, qui représente  
30 le nombre de cellules par champ microscopique en fonction de la concentration exprimée en ng/ml, pour la protéine NC28 purifiée issue de levure, la cytokine IL-8 et le peptide fMLP.

On constate que la protéine NC28 ne présente qu'une faible activité de chimiotactisme sur les neutrophiles, (à des concentrations élevées supérieures à  
35 100 ng/ml) contrairement à la cytokine IL-8 et au peptide fMLP, tous deux

connus pour posséder cette activité (Yoshimura T. et al, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci-USA, 84, 9233,1 et Schiffman E. et al, 1975, J. Immunol., 114, 1831).

La protéine NC28 est donc un chimioattractant puissant et spécifique des monocytes.

REVENDICATIONS

1. Protéine présentant une activité de type cytokine, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence (a1) suivante :

5

Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu  
 1                      5                      10

10

et immédiatement en amont de la séquence (a1), une partie de la séquence (a2) suivante :

15

Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile  
 1                      5                      10                      15  
 Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr  
 20                      25                      30  
 Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp  
 35                      40                      45  
 Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe  
 50                      55                      60

20

ou d'une séquence différent de un ou plusieurs acides aminés de la séquence (a2) et conférant à la protéine la même activité.

2. Protéine présentant une activité de type cytokine, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence (a2) :

25

30

Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile  
 1                      5                      10                      15  
 Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr  
 20                      25                      30  
 Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp  
 35                      40                      45  
 Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe  
 50                      55                      60

35

et immédiatement en aval de ladite séquence (a2) la séquence (a1) :

Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu  
1 5 10

5

ou une séquence différent de un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence (a1) conférant à la protéine la même activité.

3. Protéine selon la revendication 1, caractérisé en ce que la partie de la séquence (a2) immédiatement en amont de la séquence (a1), est choisie parmi les séquences suivantes :

10

Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe et Gln Asp Phe

4. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que la partie de la séquence (a2) ou d'une séquence différent de un ou plusieurs acides aminés de la séquence (a2) et conférant à la protéine la même activité, immédiatement en amont de la séquence (a1) est choisie parmi la séquence (a2) et les séquences (a3) et (a4) suivantes :

15

20 (a3) Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile Asn Lys  
1 5 10 15  
Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr Ser Ser  
20 25 30  
His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp Lys Glu  
25 35 40 45  
Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe  
50 55 60

(a4) Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr Ser Ser  
30 1 5 10 15  
His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp Lys Glu  
20 25 30  
Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe  
35 40 45

35

ou parmi les séquences qui diffèrent de un ou plusieurs acides aminés de la séquence (a3), (a4) ou (a2) et confèrent à la protéine la même activité.

- 5      5.      Protéine selon la revendication 4, caractérisée en ce que la partie de la séquence (a2) immédiatement en amont de la séquence (a1), est la séquence (a2).
- 10      6.      Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comporte un blocage aminoterminal.
- 15      7.      Protéine selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisée en ce qu'elle a une masse moléculaire apparente de  $9 \pm 2$  kDa.
- 15      8.      Protéine selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisée en ce qu'elle a une masse moléculaire apparente de  $11 \pm 2$  kDa.
- 20      9.      Protéine selon l'une des revendications 5 et 6, caractérisée en ce qu'elle a une masse moléculaire apparente de  $16 \pm 2$  kDa.
- 20      10.     Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle est O-glycosylée.
- 25      11.     Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle est N-glycosylée.
- 25      12.     Protéine selon l'une des revendications 4 et 5, caractérisée en ce qu'elle a un degré de pureté supérieur à 90 %.
- 30      13.     Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle a un degré de pureté supérieur à 95 %.
- 35      14.     ADN recombinant caractérisé, en ce qu'il code pour une protéine selon l'une des revendications 4 et 5 ou pour un précurseur d'une protéine selon l'une des revendications 4 et 5.

- 61 -

15. ADN recombinant caractérisé en ce qu'il code pour un précurseur d'une protéine selon l'une des revendications 4 et 5, qui comprend une séquence signal.
- 5 16. ADN recombinant selon la revendication 15, caractérisé en ce que la séquence signal est une séquence choisie parmi les séquences (b1), (b2) et (b3) suivantes :
- (b1) Met Lys Ala Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala  
 10 1 5 10 15  
 Phe Ser Pro Gln Gly Leu Ala  
 20
- (b2) Met Pro Ser Pro Ser Asn Met Lys Ala Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu  
 1 5 10 15  
 15 Leu Leu Thr Ala Ala Ala Phe Ser Pro Gln Gly Leu Ala  
 20 25
- (b3) Met Trp Lys Pro Met Pro Ser Pro Ser Asn Met Lys Ala Ser Ala Ala  
 1 5 10 15  
 20 Leu Leu Cys Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Phe Ser Pro Gln Gly Leu  
 20 25 30  
 Ala
17. ADN recombinant selon la revendication 16, caractérisé en ce que la  
 25 séquence nucléotidique codant pour la protéine mature est la séquence (Na2) suivante :
- CAGCCAGTTG GGATTAATAC TTCAACTACC TGCTGCTACA  
 GATTTATCAA TAAGAAAATC CCTAAGCAGA GGCTGGAGAG  
 30 CTACAGAAGG ACCACCAGTA GCCACTGTCC CCGGGAAGCT  
 GTAATCTTCA AGACCAAACCT GGACAAGGAG ATCTGTGCTG  
 ACCCCACACA GAAGTGGGTC CAGGACTTTA TGAAGCACCT  
 GGACAAGAAA ACCCAAACCTC CAAAGCTT

18. ADN recombinant selon la revendication 16, caractérisé en ce que les séquences nucléotidiques codant pour les séquences d'acides aminés (b1), (b2) et (b3) sont choisies parmi les séquences (Nb1), (Nb2) et (Nb3) suivantes :

5

(Nb1) ATGAAAGCCT CTGCAGCACT TCTGTGTCTG CTGCTCACAG  
CAGCTGCTTT CAGCCCCCAG GGGCTTGCT

10

(Nb2) ATGCCCTCAC CCTCCAACAT GAAAGCCTCT GCAGCACTTC  
TGTGTCTGCT GCTCACAGCA GCTGCTTTCA GCCCCCAGGG  
GCTTGCT

15

(Nb3) ATGTGGAAGC CCATGCCCTC ACCCTCCAAC ATGAAAGCCT  
CTGCAGCACT TCTGTGTCTG CTGCTCACAG CAGCTGCTTT  
CAGCCCCCAG GGGCTTGCT

19. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il contient, avec les moyens nécessaires à son expression, un ADN recombinant selon l'une des revendications 14 à 18.

20

20. Cellules animales, caractérisées en ce qu'elles contiennent, avec les moyens nécessaires à son expression, un ADN recombinant selon l'une des revendications 14 à 18.

25

21. Cellules animales selon la revendication 20, caractérisées en ce qu'elles contiennent un vecteur d'expression selon la revendication 19.

22. Cellules animales, selon l'une des revendications 20 et 21, caractérisées en ce qu'elles sont des cellules CHO.

30

23. Cellules animales, selon l'une des revendications 20 et 21, caractérisées en ce qu'elles sont des cellules COS.



24. Levure caractérisée en ce qu'elle contient, avec les moyens nécessaires à son expression, un ADN recombinant selon l'une des revendications 14 à 18.
- 5 25. Procédé de préparation d'une protéine selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de culture de cellules animales selon l'une des revendications 21 et 22, suivie de l'isolement et de la purification de la protéine recombinante.
- 10 26. Procédé de préparation d'une protéine selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'il comprend une étape de culture de levure selon la revendication 23 suivie de l'isolement et de la purification de la protéine recombinante.
- 15 27. Médicament caractérisé en ce qu'il contient une protéine selon l'une des revendications 1 à 13.

1/12

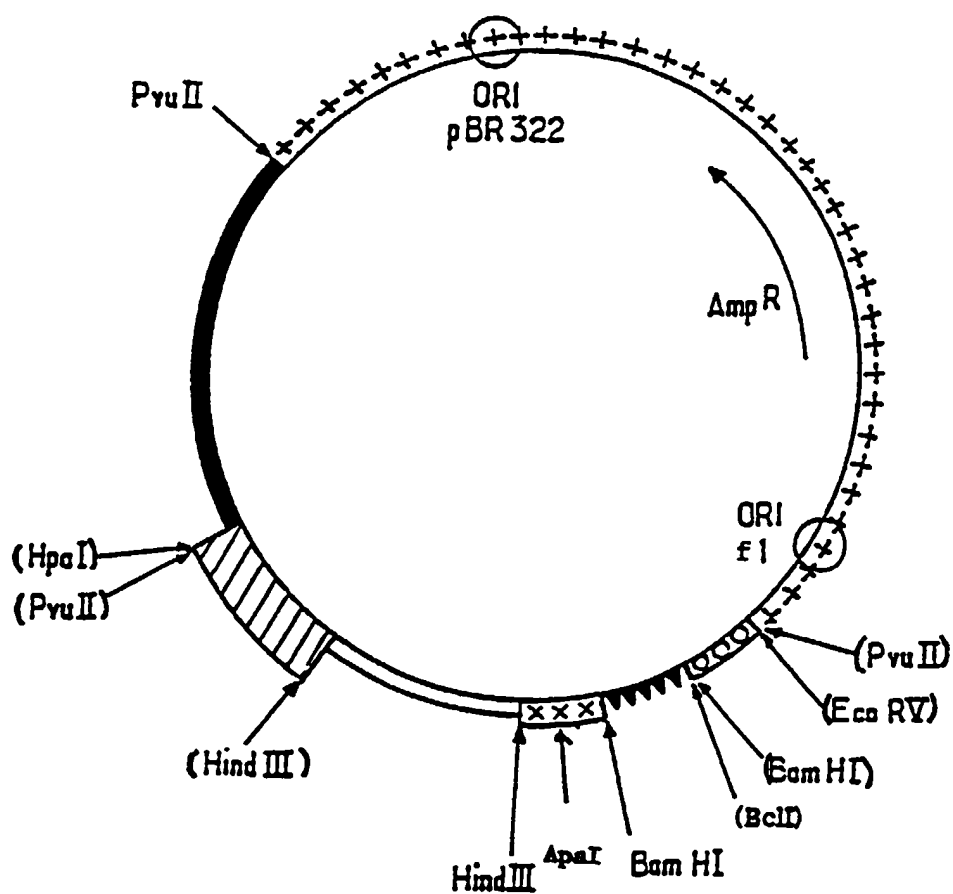


FIG.1a

Plasmide pSE1

2 / 12

## FIG.1b (voir suite)

site liant à HindIII



```
1  AGCTGGCTCGCATCTCTCCGCGCCCGCCGCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCC 60
      CCGAGCGTAGAGAGGAAGTGC GCGGGCGCGGGATGGACTCCGGCGGTAGGTGCGG
05
      GGTGAGTCGGTTCTGCCGCTCCCGCTGTGGTGCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTA
      61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+120
      CCACTCAGCGCAAGACGGCGGAGGGGACACACGGAGGACTTGACGCAGGCGGCAGAT
      GGTAGGCTCCAAGGAGCCGGACAAAGGCCCGGTCTCGACCTGAGCTCTAAACTTACCTA
10  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+180
      CCATCCGAGGTTCCCTCGGCCTGTTCCGGGCCAGAGCTGGACTCGAGATTTGAATGGAT
      GACTCAGCCGGGCTCTCCACGCTTTGCCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCIACGTCITTTGTT
15  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+240
      CTGAGTCGGCCGAGAGGTGCGAAACGGACTGGGACGAACGAGTTGAGATGCAGAAACAAA
```

3 / 12

## FIG. 1b (suite)

20 241 CGTTTCTGTCTGCGCCGTTACAACCTCAAGGTATGCGCTGGGACCTGGCAGGCGGCAT  
-----+-----+-----+-----+-----+300  
GCAAAAGACAAGACGCGGCAATGTTGAAGTTCCATACGCGACCCCTGGACCGTCCGCCCGTA  
CTGGGACCCCTAGGAAGGGCTTGGGGGTCCTCGTGCCCAAGGCAGGGAACATAGTGGTCC  
301 -----+-----+-----+-----+-----+360  
25 GACCCCTGGGGATCCTTCCCGAACCCCAAGGAGCACGGGTTCGTCCTTGATACACCAGG  
CAGGAAGGGAGCAGAGGCATCAGGGTGTCCACTTTGTCTCCGCAGCTCCTGAGCCTGCA  
361 -----+-----+-----+-----+-----+420  
30 GTCCCTCCCTCGTCTCCGTAGTCCACAGGTGAACAGAGGGGTGAGGACTCGGACGT

GA

-----

CTTCGA ▲

HindIII

## FIG. 2 (voir suite)

	AGCAGAGGGGCTGAGACCAACCAAGAAACCTCCAATTCTCATGTGGAGCCCATGCC	58
	MetTrpLysProMetPro	6
59	TCACCCCTCCAACATGAAGCCCTCTGCAGCAGCTTCTGTGTCTGTCTCACAGCAGCTGCT	118
7	SerProSerAsnMetLysAlaSerAlaAlaLeuLeuCysLeuLeuThrAlaAlaAla	26
119	TTCAGCCCCCAGGGGCTTGCTCAGCCAGTTGGGATTAATACTTCAACTACCTGTGCTAC	178
27	PheSerProGlnGlyLeuAlaGlnProValGlyIleAsnThrSerThrCysCysTyr	46
	↑	
179	AGATTATCAATAAGAAATCCCTAAGCAGAGGGCTGGAGAGCTACAGAAGGACCACCACT	238
47	ArgPheIleAsnLysLysIleProLysGlnArgLeuGluSerTyrArgArgThrThrSer	66
239	AGCCACTGTCCCCGGGAGCTGTAATCTTCAAGACCAAACTGGACAAGGAGATCTGTGCT	298
67	SerHisCysProArgGluAlaValIlePheLysThrLysLeuAspLysGluIleCysAla	86
299	GACCCACACAGAGTGGGTCCAGGACTTTATGAAGCACCTGGACAAGAAACCCAAACT	358
87	AspProThrGlnLysTrpValGlnAspPheMetLysHisLeuAspLysLysThrGlnThr	106
359	CCAAAGCTTTGAACATTTCATGACTGAACCTAAACCAAGCCCATGACTTGAGAAACAAATAA	418
107	ProLysLeu	126

4 / 12

## FIG. 2 (suite)

419 TTTGTATACCCGTGTCCTTCTCAGAGTGGTCTGAGATTATTTAACTAATCTAAGGA 478  
479 ATATGAGCTTTATGTAAATAATGTGAATCATGGTTTTCTTAGTAGATTTTAAAAGTTATT 538  
539 AATATTTTAATTAACTCTCCATGGATTTTGGTGGGTTTTGAACATAAAGCCTTGGATGT 598  
599 ATATGTCATCTCAGTGCTGTAAAACTGTGGGATGCTCCTCCCTCTCTACCTCATGGGG 658  
659 GTATTGTATAAGTCCCTTGCAAGAAATCAGTGCAAGAATTGCTTTAAATTGTTAAGATATGA 718  
719 TGTCCCTATGGAAGCATATTGTTATTATATAATAATTACATATTGTCATATGTATGACTCCCA 778  
779 AATTTTCACATAAAATAGATTTTGTAAAAA..... 820

5 / 12

6 / 12

```

1  MetTrpLysProMetProSerProSerAsn  MetLysAlaSerAlaAlaLeuLeuCysLeu  20
      | | | | | | | | | | | | | | | |
1  ..... MetLysValSerAlaAlaLeuLeuCysLeu  10

21  LeuLeuThrAlaAlaAlaPheSerProGln  GlyLeuAlaGlnProValGlyIleAsnThr  40
      | | | | | | | | | | | | | | | |
11  LeuLeuIleAlaAlaThrPheIleProGln  GlyLeuAlaGlnProAspAlaIleAsnAla  30

41  SerThrThrCysCysTyrArgPheIleAsn  LysLysIleProLysGlnArgLeuGluSer  60
      . . | | | | . | | | | | | | | | |
31  ProValThrCysCysTyrAsnPheThrAsn  ArgLysIleSerValGlnArgLeuAlaSer  50

61  TyrArgArgThrThrSerSerHisCysPro  ArgGluAlaValIlePheLysThrLysLeu  80
      | | | | . | | | | | | | | | | |
51  TyrArgArgIleThrSerSerLysCysPro  LysGluAlaValIlePheLysThrIleVal  70

81  AspLysGluIleCysAlaAspProThrGln  LysTrpValGlnAspPheMetLysHisLeu  100
      . | | | | | | | | | | | | | | |
71  AlaLysGluIleCysAlaAspProLysGln  LysTrpValGlnAspSerMetAspHisLeu  90

```

FIG. 3

```

101  AspLysLysThrGlnThrProLysLeu  109
      | | | | | | | | | |
91  AspLysGlnThrGlnThrProLysThr  99

```

FIG. 3

# FIG. 4 (voir suite)

```

1 AGCAGAGGGGCTGAGACCAAAACCAGAAACCCTCCATTCTCATGTGGAGC 50
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1 AACCGAGAGGCTGAGACTAAACCCAGAAAGATCCATTCTCAAACTGAAGC 50

51 CCATGCCCTCACCCTCCAAACATGAAGCCCTCTGCAGCACCTTCTGTGCTG 100
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
51 TCGCACTCTC.GCCTCCAGCATGAAGTCTCTGCGGCCCTTCTGTGCTG 99

101 CTGCTCAGCAGCTGCTTTTCAGCCCCCAGGGGCTTGCTCAGCCAGTTGG 150
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
100 CTGCTCATAGCAGCCACCTTCATTCCCCAAGGGCTCGCTCAGCCAGATGC 149

151 GATTAACTATTCAACTACCTGCTGCTACAGATTATCAATAAGAAATCC 200
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
150 AATCAATGCCCCAGTCACTGCTGTATTAACTTCACCAATAGGAAGATCT 199

201 CTAAGCAGAGGCTGGAGAGCTACAGAAGGACCACCAGTAGCCACTGTCCC 250
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
200 CAGTGCAGAGGCTCGCGAGCTATAGAAGAAATCACCGCAGCAAGTGTCCC 249

251 CGGGAAGCTGTAACTTCAAGACCACAACTGGACAAGGAGATCTGTGCTGA 300
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
250 AAAGAAGCTGTGATCTTCAAGACCATTGTGGCCAAGGAGATCTGTGCTGA 299

301 CCCCACACAGAAGTGGGTCCAGGACTTTATGAGCACCTGGACAAGAAA 350
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
300 CCCCAGCAGAAGTGGGTTCAGGATTCCATGGACCACCTGGACAAGCAA 349

351 CCCAAACTCCAAAGCTTTGAACATTCAATGACTGAACATAAAACAAGCCAT 400
  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
350 CCCAAACTCCGAAGACTTGAACACTCACTCC.....ACAACCCAA 389

```

FEUILLE DE REMPLACEMENT



401 GACTTGAGAAACAAATAATTTGTATACCCGTGCTCCTTCTCAGAGTGGTTC 450  
 111 1 111111 11111 1111 111 11111 1  
 390 GAATCTGCAGCTAACCTTATTT...TCCCCTAGCTTTCCCCAGACACCCCTG 436  
 451 TGAGATTATTTTAATCTAAATCTTAAGGAATATGAGCTTTATGTAATAATG 500  
 1 111 111 111 111 1 1 1 111  
 437 TTTTATTTTATATATAATGAATTTTGTGTGGATGTGAACATATTATGCC 486  
 501 TGAATCATGGTTTTCCTTAGTAGATTTTAAAGTTATTAATAATTTTAAAT 550  
 1 111111 111111 1 111111 111111 111111 1  
 487 TAAAGTAATGTTAAATCTTA.....TTTAAAGTTATTTGATGTTTTAAAGT 528  
 551 TAAATCTCCATGGATTTTGGTGGTTTTGAACATAAAGCCTTGGATGTAT 600  
 1111111111 111111 1111 1111 1111111111 111111 111111  
 529 TTATCTTTTCAATGG.TACTAGTGTTTTTTAGATACAGAGACTTGGGGAAAT 577  
 601 ATGTCATCTCAGTCTGTAAAAaACTGTGGGATGCTCCCTCTCTCTACC 650  
 1 11 111 111 111 1 1111 1111 111 111  
 578 TGCCTTTTC.....CTCTTGAACCAAGTCTACCCCTGGGATGTTTTGA 621  
 651 TCATGGGGGTATGTATAGTCTCTGCAaGaaCCAGTGCaaaAGATNTGC 700  
 1 11 111 111 111 111111 1 111111  
 622 GGGCTCTTGGCA.AGAATCATTAATAACAaaAGAAATTTTTTTTAAACATCCAA 670  
 701 TTAATTGTTAAAGATATGATGTCCCTATGGaaAGCATATTTGTTATATATA 750  
 1 1111 111 1111 111 1 111 111111 1111 1111 1111 1111  
 671 TGCATTGCTAAaAATATATTGTGGAAATGAa.TATTTGTAACTATTACA 719  
 751 TTACATATTTCATATGATGACTCCCAaATTTTCAATAAATAGATTT 800  
 1 111 111 111 111  
 720 CCAATAAATATATTTTGTAC..... 741

9 / 12

H  
i  
n  
d  
I  
I  
I

AGCTTGGATAAAAGACAGCCAGTTGGGATTAATACTTCAACTACCTGCTGCT  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
 ACCTATTTTCTGTCTGGTCAACCCTAATTATGAAGTTGATGGACGACGA

ACAGATTTATCAATAAGAAAATCCCTAAGCAGAGGCTGGAGAGCTACAGAAGGACCACCA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
 TGTCTAAATAGTTATTCTTTTAGGGATTCTGTCCTCCGACCTCTCGATGTCTTCCTGGTGGT  
 GTAGCCACTGTCCCCGGGAAGCTGTAATCTTCAAGACCAAACCTGGACAAGGAGATCTGTG  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
 CATCGGTGACAGGGGCCCTTCGACATTAGAAGTTCTGGTTTGACCTGTTCTCTAGACAC  
 CTGACCCCAACACAGAAGTGGGTCCAGGACTTTATGAAGCACCTGGACAAGAAAACCCAAA  
 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
 GACTGGGGTGTGTCTTCACCCAGGTCCTGAAATACTTCGTGGACCTGTTCTTTTGGGTTT.

B  
a  
m  
H  
I

CTCCAAA<sup>\*</sup>CTTTGAG  
 -----+-----  
 GAGGTTTTGAAACTCCTAG

FIG. 5

10 / 12

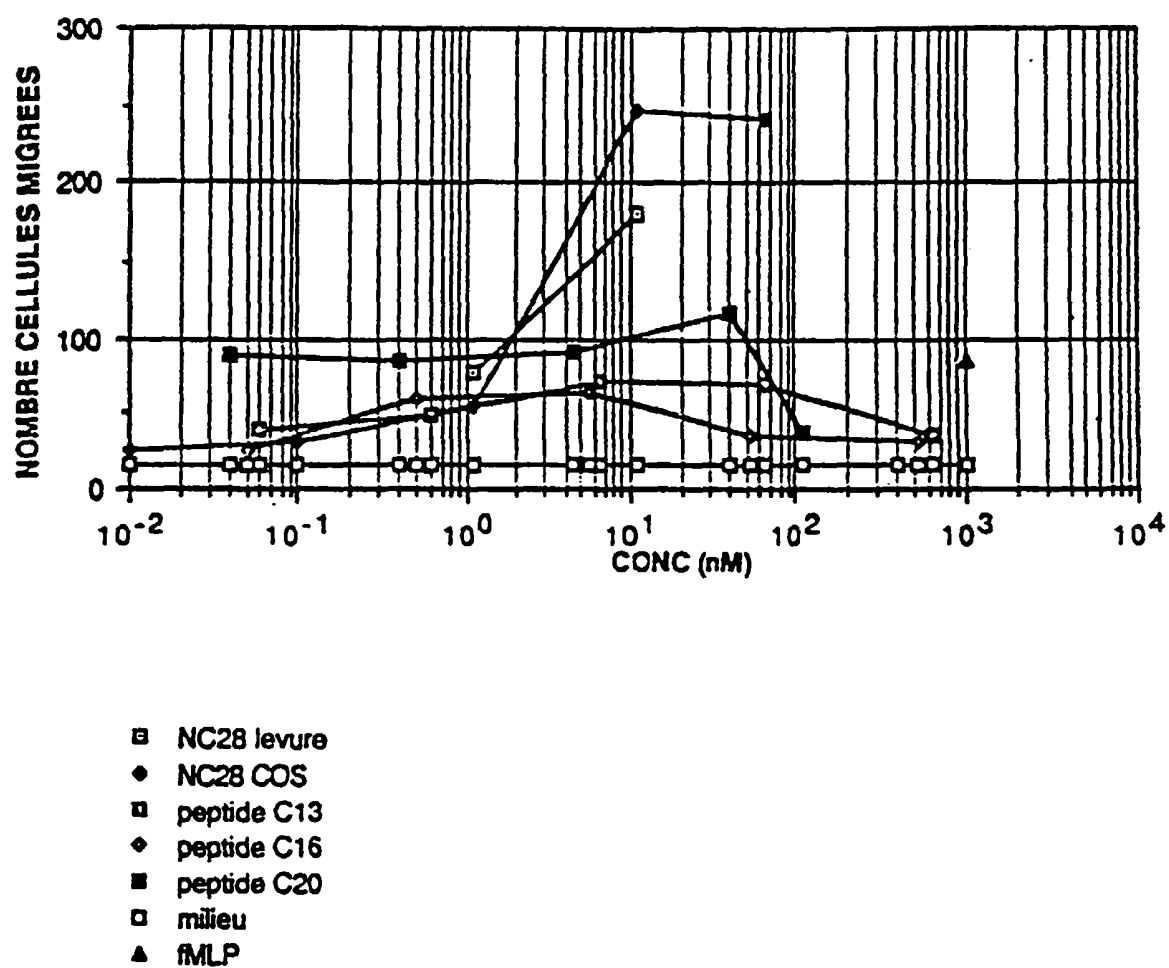


FIG. 6a

11 / 12

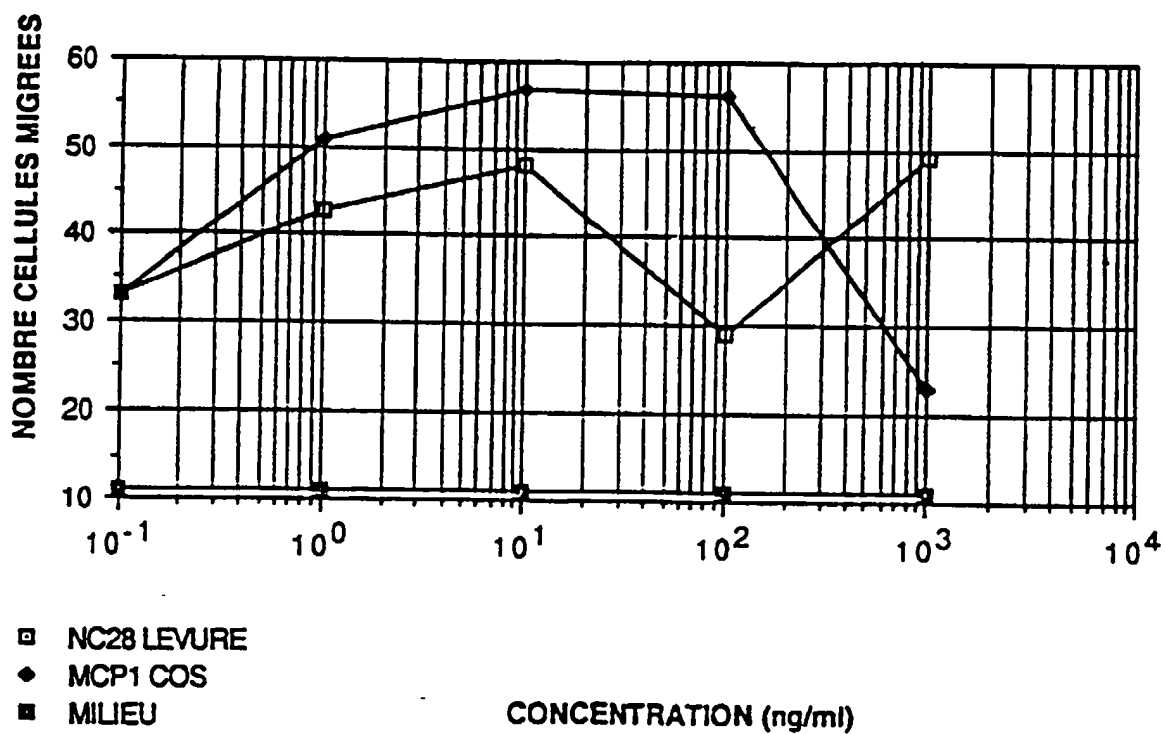


FIG.6b

12 / 12

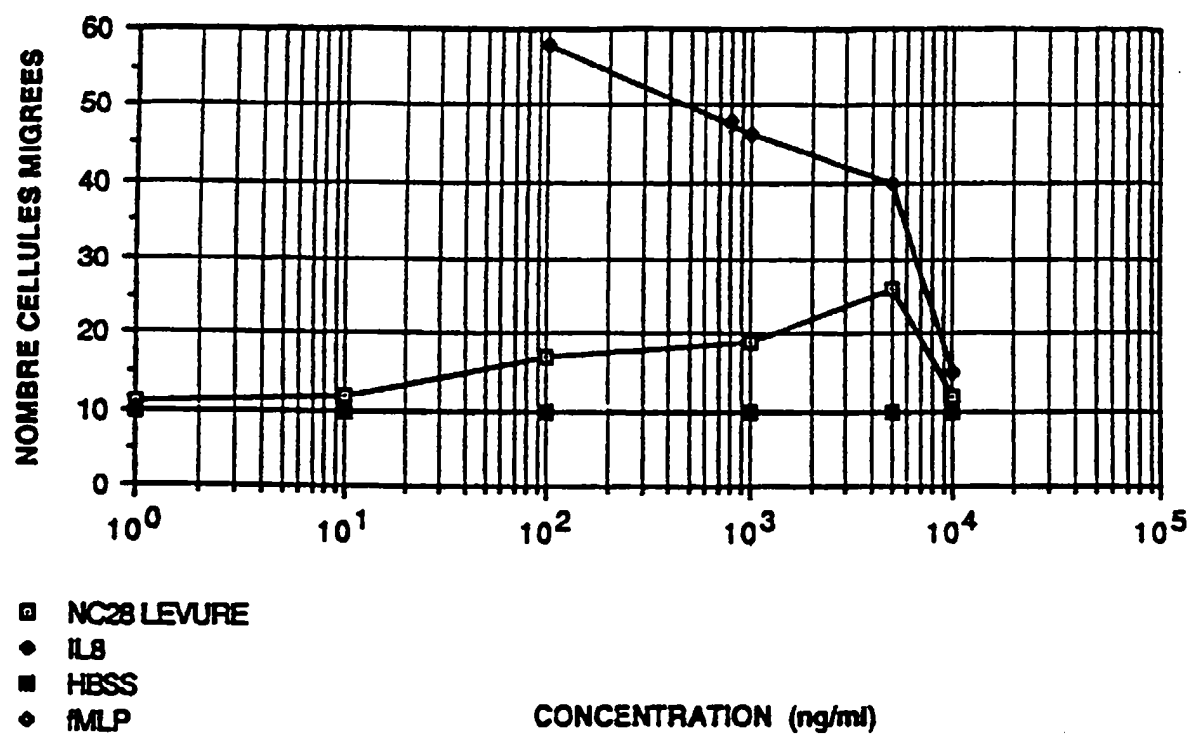


FIG. 6c

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR91/00949

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl.5      C07K 13/00;      C12N 15/19;      C12P 21/02;      A61K 37/02 C12N 5/10;      C12N 1/19		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched †		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl.5	C07K;    C12N;    C12P	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ‡		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT §</b>		
Category *	Citation of Document, †† with indication, where appropriate, of the relevant passages ‡‡	Relevant to Claim No. ‡‡
A	WO, A, 9 008 777 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 9 August 1990 see claims; figure 2 ---	1-27
A	WO, A, 9 007 863 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 26 July 1990 see the whole document -----	1-27
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: †‡</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search 24 February 1992 (24.02.92)		Date of Mailing of this International Search Report 4 March 1992 (04.03.92)
International Searching Authority European Patent Office		Signature of Authorized Officer

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9100949  
SA 54522**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information. 24/02/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9008777	09-08-90	AU-A- 5048090	24-08-90
		AU-A- 5160390	24-08-90
		CA-A- 2006964	31-07-90
		WO-A- 9008778	09-08-90
WO-A-9007863	26-07-90	JP-A- 3187380	15-08-91
		JP-A- 2207788	17-08-90
		AU-A- 4845090	13-08-90
		CA-A- 2006969	01-07-90
		EP-A- 0452391	23-10-91

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00949

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C07K13/00; C12N5/10;	C12N15/19; C12N1/19	C12P21/02; A61K37/02
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C07K ; C12N ; C12P	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>a</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
A	WO,A,9 008 777 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 9 Août 1990 voir revendications; figure 2 ---	1-27
A	WO,A,9 007 863 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 26 Juillet 1990 voir le document en entier ---	1-27
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>a</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
24 FEVRIER 1992	04 MAR 1992	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	LE CORNEC N.D.R.	



**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100949  
SA 54522

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date de

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 24/02/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9008777	09-08-90	AU-A-	5048090	24-08-90
		AU-A-	5160390	24-08-90
		CA-A-	2006964	31-07-90
		WO-A-	9008778	09-08-90
WO-A-9007863	26-07-90	JP-A-	3187380	15-08-91
		JP-A-	2207788	17-08-90
		AU-A-	4845090	13-08-90
		CA-A-	2006969	01-07-90
		EP-A-	0452391	23-10-91

EPO FORM P047